

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-339292

(43)公開日 平成5年(1993)12月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		8619-4H		
C 1 2 N 5/10				
15/15	ZNA			
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B		
		8931-4B		
		C 1 2 N 15/ 00	A	

審査請求 未請求 請求項の数24(全 35 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-31855	(71)出願人	000000217
(22)出願日	平成5年(1993)2月22日		エーザイ株式会社
(31)優先権主張番号	特願平4-90488		東京都文京区小石川4丁目6番10号
(32)優先日	平4(1992)4月10日	(72)発明者	加藤 弘之
(33)優先権主張国	日本(JP)		茨城県北相馬郡守谷町御所ヶ丘5丁目25番地41
		(72)発明者	吉武 新次
			茨城県つくば市二の宮4丁目5番地61号
		(72)発明者	鈴木 豪
			茨城県牛久市刈谷町2丁目1番地
		(72)発明者	鈴木 昇
			茨城県つくば市梅園2丁目33番地24号
		(74)代理人	弁理士 古谷 肇 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトアンチトロンビンIII変異体

(57)【要約】

【目的】 ヘパリン非存在下で高い抗トロンビン活性を有する、新規なヒトアンチトロンビンIII (AT III) 変異体を提供する。

【構成】 AT IIIをコードするDNAを鋳型として、AT IIIの反応部位およびヘパリン結合部位のアミノ酸を他のアミノ酸に遺伝子組換え法により変換させ目的物を得る。さらに各変異体のcDNAを組み込んだ発現ベクターにより形質転換させた宿主を培養することによる各変異体大量製造法に関する。

【効果】 抗血液凝固剤として血栓症治療に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 変異させたヒトアンチトロンビンIII

(AT III)であって、11-14位、41-47位、125-133位および384-398位の四つの領域のアミノ酸が、それぞれの領域、単独で又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換されていることを特徴とするAT III変異体。

【請求項2】 変異させたAT IIIであって、384-398位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換され、さらに11-14位、41-49位および125-133位の三つの領域のアミノ酸が、各領域単独又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された組み合わせであることを特徴とする請求項1記載のAT III変異体。

【請求項3】 変異させたAT IIIであって、384-398位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換され、さらに11-14位および41-47位の二つの領域のアミノ酸が、各領域単独又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された組み合わせであることを特徴とする請求項1記載のAT III変異体。

【請求項4】 変異させたAT IIIであって、384-398位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換され、さらに11-14位および125-133位の二つの領域のアミノ酸が、各領域単独又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された組み合わせであることを特徴とする請求項1記載のAT III変異体。

【請求項5】 変異させたAT IIIであって、384-398位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換され、さらに41-47位および125-133位の二つの領域のアミノ酸が、各領域単独又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された組み合わせであることを特徴とする請求項1記載のAT III変異体。

【請求項6】 変異させたAT IIIであって、11-14位および384-398位の二つの領域のアミノ酸がそれぞれの領域において少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された請求項1記載のAT III変異体。

【請求項7】 変異させたAT IIIであって、41-47位および384-398位の二つの領域のアミノ酸がそれぞれの領域において少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された請求項1記載のAT III変異体。

【請求項8】 変異させたAT IIIであって、125-133位および384-398位の二つの領域のアミノ酸がそれぞれの領域において少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された請求項1記載のAT III変異体。

【請求項9】 変異させたAT IIIであって、384-398位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された請求項1記載のAT III変異体。

【請求項10】 変異させたAT IIIであって、四つの領域のアミノ酸がAla, Gly, Trp, Pro, Leu, Val, Phe, Tyr, Ile, Glu, Ser, Gln, Asn および Argから選ばれ

るアミノ酸に変換されていることを特徴とする請求項1記載のAT III変異体。

【請求項11】 変異させたAT IIIであって、384-398位の領域のアミノ酸がAla, Pro, Leu, Val, Gly, Arg, Glu および Pheから選ばれるアミノ酸に変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい請求項1記載のAT III変異体。

【請求項12】 変異させたAT IIIであって、390-392位の領域のアミノ酸がAla, Pro, Leu, Val, および Pheから選ばれるアミノ酸に変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい請求項1記載のAT III変異体。

【請求項13】 変異させたAT IIIであって、392位GlyがProに変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい請求項1記載のAT III変異体。

【請求項14】 変異させたAT IIIであって、390位IleがAlaに、391位AlaがPhe, ValまたはLeuに、および392位GlyがProに、単独または組み合わせで変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい請求項1記載のAT III変異体。

【請求項15】 変異させたAT IIIであって、384位AlaがGlyに、387位AlaがPheに、389位ValがProに、397位ProがArgに、または398位AsnがGluまたはArgに、単独または組み合わせで変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい請求項1記載のAT III変異体。

【請求項16】 変異させたAT IIIであって、11位LysがIleに、14位AspがSerに、単独または組み合わせで変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい請求項1または14記載のAT III変異体。

【請求項17】 変異させたAT IIIであって、125位LysがGlnに、129位ArgがGlnに、132位ArgがGlnに、または133位LysがAsnまたはGlnに、単独または組み合わせで変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい請求項1または14記載のAT III変異体。

【請求項18】 変異させたAT IIIであって、下記アミノ酸に変換された変異体から選択される請求項1記載のAT III変異体。

(a) 392位GlyがProに変換されたAT III変異体。

(b) 391-392位Ala-GlyがPhe-Proに変換されたAT III変異体。

(c) 390-391位Ile-AlaがAla-Leuに変換されたAT III変異体。

(d) 125位LysがGlnに、391-392位Ala-GlyがPhe-Proに変換されたAT III変異体。

(e) 132-133位Arg-LysがGln-Asnに、390-391位Ile-AlaがAla-Leuに変換されたAT III変異体。

(f) 132-133位Arg-LysがGln-Asnに、391-392位Ala-GlyがPhe-Proに変換されたAT III変異体。

(g) 133位LysがAsnに、391-392位Ala-GlyがPhe-Proに変換されたAT III変異体。

【請求項19】 請求項1記載のAT III変異体をコードしているDNA。

【請求項20】 請求項19記載のDNA配列を含有した発現可能なベクター。

【請求項21】 請求項20記載の発現可能なベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項22】 形質転換された宿主細胞が大腸菌または動物細胞である請求項21記載の宿主細胞。

【請求項23】 請求項21記載の宿主細胞を培養し、産生されたAT III変異体を培養物中より分取することとを特徴とするAT III変異体の製造方法。

【請求項24】 請求項1記載のAT III変異体と薬学的に許容しうる担体とを含有する血栓性疾病用医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 ヒトアンチトロンビンIII (AT III) のアミノ酸配列中、1個または複数個のアミノ酸を他のアミノ酸に変換させることにより、ヘパリン非存在下でも高い抗プロテアーゼ活性を有するAT III変異体に関するもので、血栓性疾病の治療薬として利用される。

【0002】

【従来の技術】 ヘパリンをはじめとするグリコサミノグリカンの有する血液凝固阻害活性は、血中のアンチトロンビンIII (AT III) およびヘパリンコファクターII (HCII) により媒介される。AT IIIおよびHCIIは、いわゆるセリンと総称されるセリンプロテアーゼインヒビターである。これらのうちAT IIIは先天あるいは後天的な理由による血中レベルの低下により血栓症が発症するという報告が多く、一連のセリンプロテアーゼにより構成される血液凝固系の調節因子として生理的に重要な役割を担っている。

【0003】 ヒトAT IIIは主に肝臓で合成され正常血漿中に約 150 μ g/mlの濃度で存在する、分子量約 60kdの糖蛋白であり、トロンビンおよびXa因子をはじめとする凝固、線溶系に携わるセリンプロテアーゼを阻害することが知られている。ヒトAT IIIの一次構造は、アミノ酸配列の直接決定 (Petersen, T. E. et al., In: The Physiological Inhibitors of Blood Coagulation and Fibrinolysis, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 43, 1979) ならびにcDNAのクローニング (Bock, S. C. et al., Nucl. Acids Res., 10, 8113, 1982; Prochownik, E. V. et al., J. Biol. Chem., 258, 8389, 1982; Chandra, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1845, 1983) により明らかにされている。これらの報告によると、ヒトAT IIIは前駆体蛋白質より32残基のシグナルペプチドが切断除去されて分泌生成される、432アミノ酸からなる一本鎖糖蛋白である。分子内にN結合性の糖鎖付加を受ける部位を4ヶ所

含んでおり、分子量の約15%は糖である。

【0004】 AT IIIはトロンビンなどのセリンプロテアーゼと1:1で反応し、安定な複合体を形成することにより、これらのプロテアーゼの活性を阻害する。この際AT IIIは分子中の393番目のArg残基と394番目のSer残基の間のペプチド結合がプロテアーゼにより切断され、この結果新たに生じた末端のArg残基とプロテアーゼの活性中心のSer残基との間にアシル結合が生じると考えられている。一般的に、このArg (393)-Ser (394)を反応部位と呼ぶ。

【0005】 AT IIIによるプロテアーゼの阻害反応は比較的緩やかに進行するが、反応系にヘパリンが存在すると、その反応速度は劇的に加速され、AT IIIによるトロンビンの阻害速度はヘパリンの添加により1000倍以上となる。この作用機構はヘパリンがAT III中の特定部位 (ヘパリン結合部位) に結合することにより、AT IIIの高次構造に変化をもたらすプロテアーゼと相互作用しやすい構造をとらせるとともに、プロテアーゼもそのヘパリン分子に結合することにより3者複合体を形成しやすくなるためと考えられている。また生理的には血管内皮細胞表面に存在するヘパリン様物質が、同様の作用を現すことによりAT IIIによる血液凝固系の制御機構に重要な役割を担っていると考えられている。

【0006】 種々の原因により引き起こされる血栓症の予防、治療にはいわゆる抗凝固薬が使用されており、ヘパリンは現在でも極めて重要な抗凝固薬の一つである。しかしヘパリンの使用により時に重篤な副作用が生じることが報告されている (Amerena, J. et al., Adverse Drug React. Acute. Poisoning Rev., 9, 1, 1990; Levine, M. N., et al. Semi. in Thrombos. Hemostas., 12, 39, 1986; Kelton, J. G. et al., ibid, 12, 59, 1986; Levine, M. N., ibid, 12, 63, 1986)。代表的なものとして出血、血小板減少症、副腎機能障害、過敏症、投与部位の壊死、骨粗鬆症等があげられる。このため産婦人科領域あるいは外科手術後など出血の危険性が高い場合、あるいは長期にわたる投与においてはその使用は慎重に行われるべきである。さらにヘパリンは試験管内で好中球のエラスターゼによるAT IIIの不活性化を促進するという報告もあり (Jordan, R. E. et al, Science, 237, 777, 1987; Jordan, R. E. et al., J. Biol. Chem., 264, 10493, 1989)、重篤な感染症あるいは敗血症などの好中球のエラスターゼが病態に関与していると考えられる場合の投与においては考慮されるべきである。またヘパリンの抗凝固作用はあくまでもAT IIIを介したものであり、血中のAT III濃度が低下しているような病態ではその効果は期待されない。

【0007】 一方、ヒトAT IIIは血漿由来の濃縮製剤という形で、先天性的AT III欠乏に基づく血栓形成傾向、およびAT III低下を伴う汎発性血管内凝固症候群 (DIC) において臨床的に用いられている。しかし先に述

べたように、ヘパリン非存在下におけるAT IIIの抗凝固活性は漸進的なもので、単独の使用は補充療法的な意味合いが強く、抗凝固薬としての有用性は限定される。そこでAT IIIの抗凝固薬としての有用性を高めるために、AT IIIとヘパリンの併用あるいはAT IIIとヘパリンの複合体を調製し、これを用いるといった方法が検討されている。しかしこれらの方法においても前述のヘパリンの有する欠点を除くことができないことは明らかである。

【0008】上記の如く、AT IIIには反応部位およびヘパリン結合部位という2つの機能部位が存在する。反応部位近傍のアミノ酸配列はプロテアーゼインヒビターとしての機能発現に重要な役割を担っていると、各種プロテアーゼに対する阻害特異性を決定する上でも重要であることが多くの報告により明らかとなっている。例えば先天性AT III異常症のなかで382位のAlaがThrに置換したAT III Hamilton (Devraj-Kizuk, R. et al., Blood, 72, 1518, 1988)、384位のAlaがProに置換したAT III Cambridge I (Perry, P. J. et al., FEBS Lett., 254, 174, 1989)、393位のArgがHisに置換したAT III Glasgow (Erdjument, H. et al., J. Biol. Chem., 263, 5589, 1988)、同じくProに置換したAT III Pescara (Lane, D. A. et al., J. Biol. Chem., 264, 10200, 1989)、394位のSerがLeuに置換したAT III Denver (Stephens, A. W. et al., J. Biol. Chem., 262, 1044, 1987) などにおいては異常AT III分子はいずれも抗プロテアーゼ活性を失っており、これらの患者は血栓症を発症している。

【0009】一方、ヘパリン結合部位すなわちヘパリンとの結合に直接関わっているアミノ酸は、やはりAT IIIの先天性分子異常症に関する研究およびアミノ酸残基の化学修飾の結果より明らかとなってきた。分子異常症では7位のIleがAsnに変換したAT III Rouen III (Brennan, S. O. et al., FEBS Lett., 237, 118, 1988)、24位のArgがCysに置換されたAT III Rouen IV (Borg, J. Y. et al., FEBS Lett., 266, 163, 1990)、41位のProがLeuに置換されたAT III Basel (Chang, J. Y. and Tran, T. H., J. Biol. Chem., 261, 1174, 1986)、47位のArgがCysに置換されたAT III Toyama (Koide, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 81, 289, 1984)、129位のArgがGlnに置換されたAT III Geneva (Gandrille, S. et al., J. Biol. Chem., 265, 18997, 1990) 等が報告されている。これらの異常AT IIIではいずれもヘパリン親和性が低下しており、生理的に正常な機能を持ち得ないために血栓症を発症している。さらにアミノ酸の化学修飾の実験より49位のTrp、114位のLys、125位のLys、129位のArg、136位のLys、145位のArg等のアミノ酸がヘパリンとの結合に直接関与していると考えられている (Blackburn, M. N. et al., J. Biol. Chem., 259, 939, 1984; P

eterson, C. et al., J. Biol. Chem., 262, 8061, 1987; Sun, X. J. and Chang, J. Y., Biochemistry, 29, 8957, 1990)。

【0010】これらの知見をもとにこれまでAT IIIのアミノ酸を変換することによりAT IIIの改良が試みられている。たとえば ZettlemeysslerらはAT III中の糖鎖付加部位のアミノ酸を変換することによって、ヘパリン結合/ヘパリン活性化の性質を向上させるAT III変異体、および反応部位のアミノ酸を変換することにより酵素特異性を変化させたAT III変異体の製造法を開示している (特開平2-262598)。また Dijkemaらは反応部位のアミノ酸を変換することによって抗トロンビン/抗Xa活性の変化したAT III変異体の製造法を示した (EP90/01026)。しかしながら、臨床的に満足するAT III変異体は見いだされておらず、ヘパリン非存在下でのトロンビンあるいはXa因子阻害活性を上昇させたAT III変異体の作製が強く望まれている。

【0011】

【発明が解決しようする課題】本発明はヘパリン非存在下でも高い抗トロンビン活性を有する、新規なAT III変異体を提供することにある。さらに遺伝子組換え法による大量製造法をも提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】ヘパリンによるAT IIIの抗プロテアーゼ活性増強のメカニズムは現在次のように考えられている。まずヘパリンがAT IIIのヘパリン結合部位に結合することにより、AT IIIの立体構造をプロテアーゼとより反応しやすい構造へと変換する。同時にプロテアーゼもそのヘパリン結合部位において同一のヘパリン分子と結合することにより、結果的にAT IIIとプロテアーゼの複合体形成速度が上昇する (Pletcher, C. H. and Nelstuen, G. L., J. Biol. Chem., 258, 1086, 1988)。この仮説に従うと、AT IIIのヘパリン結合部位にヘパリンが結合することにより引き起こされる、反応部位の立体構造の変化が、抗プロテアーゼ活性の増強において重要であると考えられる。このことは反応部位近傍のアミノ酸配列を人為的に変換することで反応部位の立体構造を変化させることにより、ヘパリン非存在下でのプロテアーゼ活性が上昇したAT III変異体を製造することが可能であることを示している。

【0013】一方このような考えに基づきヘパリン非存在下の抗トロンビン活性が上昇したAT III変異体が得られたならば、そのAT III変異体にとってヘパリンと結合するということは重要な性質とはなり得ないと考えられる。したがってヘパリン結合部位に変異を来したために機能異常となった前述のAT III TOYAMA, GENEVAなどと異なり、ヘパリン結合部位にアミノ酸置換を導入しヘパリン親和性を低下させても機能的に影響は少ないと考えられる。むしろ血管内皮細胞表面のヘパリン様物質との相互作用が低下することにより、血中半減期の延

長、好中球エラスターゼによる失活の回避などがもたらされ、臨床的な有用性が増すことも考えられる。このような考えに基づき、本発明者らはAT IIIの改良を鋭意研究の結果、目的とする新規なAT III変異体作製に成功し本発明を完成した。

【0014】本発明は、変異させたヒトアンチトロンビンIII (AT III) であって、

(1) 11-14 位、41-47 位、125-133 位および 384-398 位の四つの領域のアミノ酸が、それぞれの領域、単独で又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換されていることを特徴とするAT III変異体。

(2) 384-398 位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換され、さらに 11-14位、41-49 位および 125-133位の三つの領域のアミノ酸が、各領域単独又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された組み合わせであることを特徴とする(1)記載のAT III変異体。

(3) 384-398 位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換され、さらに 11-14位および 41-47 位の二つの領域のアミノ酸が、各領域単独又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された組み合わせであることを特徴とする(1)記載のAT III変異体。

(4) 384-398 位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換され、さらに 11-14位および 125-133位の二つの領域のアミノ酸が、各領域単独又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された組み合わせであることを特徴とする(1)記載のAT III変異体。

(5) 384-398 位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換され、さらに 41-47位および 125-133位の二つの領域のアミノ酸が、各領域単独又は組み合わせで少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された組み合わせであることを特徴とする(1)記載のAT III変異体。

【0015】(6) 11-14 位および 384-398位の二領域のアミノ酸がそれぞれの領域において少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された(1)記載のAT III変異体。

(7) 41-47 位および 384-398位の二領域のアミノ酸がそれぞれの領域において少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された(1)記載のAT III変異体。

(8) 125-133 位および 384-398位の二領域のアミノ酸がそれぞれの領域において少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された(1)記載のAT III変異体。

(9) 384-398 位の領域のアミノ酸が少なくとも一個、他のアミノ酸に変換された(1)記載のAT III変異体。

(10) 四つの領域のアミノ酸がAla, Gly, Trp, Pro, Leu, Val, Phe, Tyr, Ile, Glu, Ser, Gln, Asn および Ar

gから選ばれるアミノ酸に変換されている(1)記載のAT III変異体。

【0016】(11) 384-398 位の領域のアミノ酸がAla, Pro, Leu, Val, Gly, Arg, Glu および Pheから選ばれるアミノ酸に変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい(1)記載のAT III変異体。

(12) 390-392 位の領域のアミノ酸がAla, Pro, Leu, Val, および Pheから選ばれるアミノ酸に変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい(1)記載のAT III変異体。

(13) 392 位Gly が Proに変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい(1)記載のAT III変異体。

(14) 390 位 Ileが Alaに、391位 Alaが Phe, Val または Leuに、および 392位Gly がPro に、単独または組み合わせで変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい(1)記載のAT III変異体。

(15) 384 位 Alaが Glyに、387 位Ala が Pheに、389 位 Valが Proに、397 位Proが Argに、または 398位 AsnがGlu または Argに、単独または組み合わせで変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい(1)記載のAT III変異体。

【0017】(16) 11位 Lysが Ileに、14位 Aspが Serに、単独または組み合わせで変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい(1) または (14) 記載のAT III変異体。

(17) 125 位 Lysが Glnに、129 位 Argが Glnに、132 位 Argが Glnに、または133位 Lysが Asnまたは Gln に、単独または組み合わせで変換され、さらに他の領域も変換されていてもよい(1) または (14) 記載のAT III変異体。

【0018】(18) 下記アミノ酸に変換された変異体から選択される(1)記載のAT III変異体。

(a) 392 位 Glyが Proに変換されたAT III変異体。

(b) 391-392 位 Ala-Glyが Phe-Proに変換されたAT III変異体。

(c) 390-391 位 Ile-Alaが Ala-Leuに変換されたAT III変異体。

(d) 125 位 Lysが Glnに、391-392位 Ala-Glyが Phe-Proに変換されたAT III変異体。

(e) 132-133 位 Arg-Lysが Gln-Asnに、390-391 位 Ile-Alaが Ala-Leuに変換されたAT III変異体。

(f) 132-133 位 Arg-Lysが Gln-Asnに、391-392 位 Ala-Glyが Phe-Proに変換されたAT III変異体。

(g) 133 位Lys がAsn に、391-392 位 Ala-Glyが Phe-Proに変換されたAT III変異体。

【0019】(19) 上記のAT III 変異体をコードするDNA、それらDNAを組み込んだ発現可能なベクター、これらベクターにより形質転換された宿主細胞、宿主細胞を用いるAT III変異体の製造方法およびこれらAT IIIを用いる医薬組成物に関する。

【0020】これらのAT III変異体はいずれも動物細胞を宿主として発現され製造され、得られた変異体は以下に示すようにヘパリン非存在下の抗トロンビン活性がヒト血漿由来のAT IIIあるいは天然型の組換えAT IIIにくらべ上昇していた。また動物実験においてもヒト血漿由来のAT IIIにくらべ強い薬効を示し、臨床上の有用性が高いものと期待される。

【0021】以下に本発明を詳細に説明する。

1) ヒトAT III cDNAの単離

ヒトAT IIIは主に肝臓において合成されるので、市販のヒト肝臓cDNAライブラリー(λgt 11、クローンテック社)を用いればよい。クローニングする方法は公知の方法、例えばヒトAT IIIアミノ酸配列に対応する合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いるブラークハイブリダイゼーション法(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)などが挙げられる。得られたクローンは必要に応じて、例えばpUC 18などのプラスミドにサブクローニングする。このようにして得られたcDNAの塩基配列はマキシムギルバート法(Maxam, A. M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977)またはジデオキシ法(Sanger, F., Science, 214, 1205, 1981)によって決定、確認することができる。得られたAT III cDNAのコーディング領域の塩基配列とそれに基づいて演繹されたアミノ酸配列は配列番号1に示した。

【0022】2) 部位特異的変異導入法

変異導入方法は、例えばZollerらの方法(Zoller, M. and Smith, M., Methods in Enzymology, 100, 468, 1983)、Kramerらの方法(Kramer, W. and Fritz, H.-J. Methods in Enzymology, 154, 350, 1987)およびVandeyarらの方法(Vandeyar, M. A. et al., Gene., 65, 129, 1988)などが挙げられる。Kramerらの方法はgapped duplex法と呼ばれるもので、M13ファージのアンバー変異体M13tv18、M13tv19などをベクターとして用いることができる。これらのベクターにAT IIIをコードするDNAをクローニングし、この一本鎖DNAとアンバー変異の入っていないM13の二本鎖DNAの断片(M13mpPをPvu IIにて切断して得たベクター断片)とを変性後アニリングさせgapped duplex DNAを得る。次にこのDNAに導入したい変異を含む合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼを作用させることによってギャップを埋めた後、大腸菌のmutS株(BMH71-18mutS)にトランスフェクションし、sup0の大腸菌でのみ増殖できるノンアンバーファージを選択することにより目的とする変異が導入されたファージを効率よく得ることができる。実際の操作には市販のキットを用いてもよい(宝酒造; Mutan-G)。一方、Vandeyarらの方法はAT IIIをコードするDNAをクローニングしたM13の一本鎖DNAに、導入したい変異を含む

オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせる。これを鋳型としdATP、dGTP、dTTP、および5-methyl-dCTPを基質としてT7 DNAポリメラーゼを作用させ二本鎖DNAを合成した後、T4 DNAリガーゼを用いて閉環状の二本鎖DNAとする。つぎにこの二本鎖DNAを制限酵素MspIで処理したのち、エキソヌクレアーゼIIIにて処理することにより変異が導入された鎖のみからなる環状一本鎖DNAを得る。これをメチル化DNAに特異的な制限システムを持たない大腸菌(SDM株)に導入することにより目的とするクローンを効率よく得る。こちらの方法でも実際の操作には市販のキットを用いてもよい(United States Biochemical Corporation; T7-GEN In Vitro Mutagenesis Kit)。導入したい変異を含む合成オリゴヌクレオチドはDNA合成機(ABI社 380A)を用いてフォスフォアミダイト法にて合成することができる。

【0023】3) AT III cDNA変異導入用鋳型の調製

上記1)で得たAT III cDNAのコーディング領域の前後に制限酵素切断部位を導入し、変異導入のための鋳型を調製する。制限酵素としては公知のものから適宜選択すればよく、本発明の場合はAT III コーディング領域の直前にHind III切断部位、直後にBgl II切断部位を導入した。まず上記1)で得たAT III cDNAを含むプラスミドをEcoR Iにて切断し、AT III全コーディング領域を含む1.5kbの断片を得る。この断片をファージM13tv18のRF (Replicative Form、二本鎖DNA)をEcoR Iにて切断し開環したもの導入する。こうして得られたクローンのうちAT IIIのセンス鎖を含む一本鎖DNAを鋳型としてKramerらの方法に従い、Hind IIIおよびBgl IIの酵素切断部位をそれぞれ含む2種の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、制限酵素切断部位をAT III cDNAのコーディング領域の前後に導入する。次いで、このようにして得られたクローンからAT III cDNA配列を含む断片を適切なプラスミドに挿入し、変異導入のための鋳型を調製する。

【0024】本発明の場合は、前記クローンをHind IIIおよびEcoR Iにて切断して得られる約1.5kbのAT III全コーディング配列を含むDNA断片を同酵素にて切断したプラスミドM13tv19RFあるいはM13mp19に挿入することにより、変異導入の鋳型を調製することができる。さらに、AT IIIのcDNAには1ヶ所制限酵素Sac I認識部位(配列番号1の721~726位の塩基部分)が存在し、反応部位とヘパリン結合部位を分断しうることから、上記クローンをHind IIIおよびSac Iにて切断して得たAT IIIのN端側、すなわちヘパリン結合部位を含むDNA断片を同じ酵素で切断したプラスミドM13tv19またはM13mp19などに導入し、ヘパリン結合部位への変異導入用鋳型を調製することができる。反応部位についてもEcoR IおよびSac Iを用い、同様な操作で可

能である。

4) 目的とする位置への変異導入

AT III アミノ酸配列において、変換させたい位置のアミノ酸を目的とする他のアミノ酸（以下、目的アミノ酸と称す）に変換させるには、前記の公知の方法に従い目的アミノ酸をコードするDNAを含む合成オリゴヌクレオチドと、3) に記載した適当なプラスミドを鋳型として用いることにより実施することができる。例えばAT III 392位 Glyを Proに変換させる時は、表1記載のAT 1 Rオリゴヌクレオチドを、391-392位 Ala-Glyを Phe-Proに変換させる時は、表1記載のAT 5 Rオリゴヌクレオチドを用いればよい。また各部位での変換させる

アミノ酸が複数個でそれぞれの位置が離れている場合は、1個ずつ順に変異導入の操作を行うことにより、いくつでも変異を導入することができる。

【0025】本発明において使用したオリゴヌクレオチドの代表例を表1および表2に、アミノ酸変換部位と目的アミノ酸を表3および表4に記載した。目的アミノ酸をコードする塩基コドン表1および表2記載のコドンに限定されるものではなく、目的アミノ酸をコードするコドンであれば、いずれも使用できる。

【0026】

【表1】

A T III 変異導入用合成オリゴヌクレオチドの塩基配列、変換アミノ酸およびその位置

オリゴヌクレオチド名	塩基配列	変換アミノ酸およびその位置
AT1R	5' GTTAGCGACCGCGGAGCAATCAC 3'	Gly392 → Pro
AT5R	5' GGGGTTTAGCGACCGCGGAAAAATCACAACAGC 3'	Ala391 → Phe Gly392 → Pro
AT7R	5' TAGCGAACGGCGCGACAGCCACAACAGCGGT 3'	Ile390 → Ala Ala391 → Val
AT9R	5' CAGCGGTACTGCCAGCTGCTTC 3'	Ala384 → Gly
AT19R	5' ACGGCCAGCAATCGGAACAGCGGTACT 3'	Val389 → Pro
AT24R	5' AATCACAACAAGGTACTTGCAG 3'	Ala387 → Phe
AT26R	5' GTTAGCGAACCGCGGATATATCACAACAGC 3'	Ala391 → Ile Gly392 → Pro
AT27R	5' GTTAGCGAACCGCGGACCAATCACAACAGC 3'	Ala391 → Gly Gly392 → Pro
AT28R	5' GTTAGCGAACCGCGGATATATCACAACAGC 3'	Ala391 → Tyr Gly392 → Pro
AT29R	5' GTTAGCGAACCGCGGCAATCACAACAGC 3'	Ala391 → Trp Gly392 → Pro
AT30R	5' GTTAGCGAACCGCGGAACAATCACAACAGC 3'	Ala391 → Val Gly392 → Pro
AT34R	5' TAGCGAACGGCCAAATAGCCACAACAGCGGT 3'	Ile390 → Ala Ala391 → Ile
AT35R	5' TAGCGAACGGCCAAAGAGCCACAACAGCGGT 3'	Ile390 → Ala Ala391 → Leu
AT38R	5' TAGCGAACGGCCAAAGAGCCACAACAGCGG 3'	Ile390 → Gly Ala391 → Leu
AT39R	5' GTTAGCGAACCGGGGAACAGCCACAACAGCGGTA 3'	Ile390 → Ala Ala391 → Val Gly392 → Pro

塩基配列中の下線は変換アミノ酸に対応する配列を示す。

【表2】

A T III変異導入用合成オリゴヌクレオチドの塩基配列、変換アミノ酸およびその位置

オリゴヌクレオチド名	塩基配列	変換アミノ酸およびその位置
AT40R	5' GTTTAGCGAACGGGGA AAAAAGCACAACAGCGGTA 3'	Ile390 → Leu Ala391 → Phe Gly392 → Pro
AT46R	5' GTTTAGCGAACGGGGA AGATCACAACAGC 3'	Ala391 → Leu Gly392 → Pro
AT48R	5' GTTTAGCGAACGGGGA TAAAGCCACAACAGCGGTA 3'	Ile390 → Ala Ala391 → Tyr Gly392 → Pro
AT49R	5' GTTTAGCGAACGGGGA AGCCACAACAGCGGT 3'	Ile390 → Ala Ala391 → Trp Gly392 → Pro
AT50R	5' GTTTAGCGAACGGGGA AGCCACAACAGCGGT 3'	Ile390 → Leu Ala391 → Trp Gly392 → Pro
AT2R'	5' GAAAGTCACCCCTCTCGGGGTTTAGCGAAC 3'	Asn398 → Glu
AT5R'	5' TTGAAAGTCACCCCTCTCGGGTTTAGCGAACG 3'	Asn398 → Arg
AT6R'	5' TTGAAAGTCACCCCTCGGCGTTTAGCGAACG 3'	Pro397 → Arg Asn398 → Arg
AT1G	5' CGGCAGTTTCAGTTGGGCA AAAGAAG 3'	Lys125 → Gln
AT2G	5' GGATTTGTTGGCGTTTGTAGAGTCGGCA 3'	Arg132 → Gln Lys133 → Asn
AT7G	5' GATAGAGTTGGCAGTTCAG 3'	Arg129 → Gln
AT8G	5' GGTGGCCTCCAGGATCTTCTG 3'	Pro 41 → Leu
AT9G	5' GGGATTTCATGGGAATGGATCGTGGGATTGCTGTGCAGAT 3'	Lys 11 → Ile Asp 14 → Ser
AT1F	5' GTTGGCTTTTGTAGAGTGC 3'	Arg132 → Gln
AT2F	5' TTGTGGCGTTTCGATAGAG 3'	Lys133 → Asn
AT3F	5' TTGTGGCTTGTGATAGAG 3'	Lys133 → Gln

[表 3]

塩基配列中の下線は変換アミノ酸に対応する配列を示す。

反应部位

アミノ酸番号	11	14	125	129	132	133	384	390	↓	395	398
天然型 A T III	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
1R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
5R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Phe Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
26R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Ile Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
27R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Gly Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
28R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Tyr Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
29R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Trp Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
30R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Val Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
46R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Leu Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
39R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ala Val Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
40R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Leu Phe Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
48R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ala Tyr Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
49R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ala Trp Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
50R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Leu Trp Pro Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
7R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ala Val Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
34R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ala Ile Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
35R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ala Leu Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
38R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Gly Leu Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
9R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Gly	Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
19R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Pro Ile Ala Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
24R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Phe Val Val Ile Ala Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Asn	
2R'	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Glu	
5R'	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg		Ser Leu Asn Pro Arg	
6R'	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	Lys	-- Ala	Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg		Ser Leu Asn Arg Arg	

A T III 変異体の変換アミノ酸

アミノ酸番号	11	14	125	129	132	133	384	390	反応部位	395	398
天然型 A T III	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
1G1R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile Ala <u>Pro</u> Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
1G5R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
1G30R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Val</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
1G35R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ala <u>Leu</u> Gly Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
2G1R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile Ala <u>Pro</u> Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
2G5R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
2G30R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Val</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
2G35R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ala <u>Leu</u> Gly Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
1F5R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
2F5R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
3F5R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
7G5R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
7G30R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Val</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
7G35R	Lys	-- Asp	-- Lys	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ala <u>Leu</u> Gly Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
9G5R	Ile	-- Ser	-- Lys	-- Arg	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
9G30R	Ile	-- Ser	-- Lys	-- Arg	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Val</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
9G35R	Ile	-- Ser	-- Lys	-- Arg	-- Arg	-- Arg	-- Ala	Thr Ala Val Val Ala <u>Leu</u> Gly Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
12G5R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
12G30R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Val</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
12G35R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- Arg	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ala <u>Leu</u> Gly Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
127G5R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- <u>Gln</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Phe</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
127G30R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- <u>Gln</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ile <u>Val</u> Pro Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		
127G35R	Lys	-- Asp	-- <u>Gln</u>	-- <u>Gln</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- <u>Gln</u> <u>Asn</u>	-- Ala	Thr Ala Val Val Ala <u>Leu</u> Gly Arg	Ser Leu Asn Pro Asn		

【0030】5) 反応部位近傍の変異とヘパリン結合部位の変異の組み合わせ

前記の如く、A T III c DNAには1ヶ所 Sac I 切断部位が存在し、これが反応部位とヘパリン結合部位の間に位置する。それゆえに上記4)に記載された方法により得られた変異A T III DNAを含むプラスミドをHind I IIおよび Sac I または Sac I および Bgl IIIにて切断する

ことにより、ヘパリン結合部位を含む断片と反応部位を含む断片を得ることができる。反応部位またはヘパリン結合部位を変異させたA T III DNAを制限酵素にて処理し、反応部位変異DNA断片とヘパリン結合部位変異DNA断片を調製し、それぞれの変異DNA断片を適切なプラスミドに連結することにより両部位を変異させたA T III変異DNAの調製ができ、この方法により両

部位の変異のいかなる組合せも可能である。両変異DNA断片を連結構築するプラスミドは宿主での発現に適しているものならばいずれも使用でき、例えばpSV2、pK4Kなどが挙げられる。表4に記載した記号で、2G35Rとは2G変異DNA断片と35R変異断片の組み合わせにより得られる変異体を意味する。

【0031】6) AT III変異体組換え発現ベクターとその形質転換体

上記記載の方法により得られたAT III変異体をコードするDNAを適切なベクターに組み込み、該ベクターを適切な宿主細胞に移入することにより形質転換体を得ることができる。これを常法により培養し、培養物よりAT III変異体を大量に生産することができる。AT III変異体をコードするDNAをAT III変異体の発現に適したベクターのプロモーター下流に制限酵素とDNAリガーゼを用いる公知の方法により再結合して組換え発現ベクターを作製することができる。ベクターは宿主内で複製、増幅可能であれば特に限定されない。プロモーターおよびターミネーターに関してもAT III変異体をコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定されず、宿主に応じて適切な組み合わせも可能である。

【0032】このようにして得られた組換え発現ベクターはコンピテントセル法 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166, 557, 1983)、リン酸カルシウム法 (Wigler, M. et al., Cell, 11, 222, 1977) などにより宿主に導入し、形質転換体を作製される。宿主としては大腸菌および動物細胞などが用いられ、得られた形質転換体はその宿主に応じた適切な培地中で培養される。培養は通常20℃～45℃、pH5～8の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。培養物からのAT III変異体の分離、精製は公知の分離、精製法を適宜組み合わせて実施すれば良い。これらの公知の方法としては塩析、溶媒沈

殿法、透析、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィなどが挙げられる。このようにして得られたAT III変異体はヘパリン非存在下で天然型AT IIIより高い抗トロンビン活性を有し、ラットでのin vivo抗血栓作用においても天然型AT IIIより強い作用を示した。

【0033】

【発明の効果】

(1) 抗トロンビン活性

テストチームAT III 2キット (第一化学薬品) を利用して、本発明のAT III変異体の抗トロンビン活性を測定した。すなわち、トロンビンの合成基質 (S-2238) を用いて、トロンビンに対する阻害活性をヘパリンの非存在下において測定した。対照としてAT III血漿濃縮製剤 (アンスロビンP; ヘキストジャパン社) を用いた。本測定において、緩衝液として0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.15M塩化ナトリウム含有50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を用い、種々の濃度に調製した検体と一定量のトロンビン (ウシ由来) を37℃で5分間反応させた。反応後、合成基質S-2238を添加し2分間に遊離してくるp-ニトロアニリン量を波長405nmの吸光度変化で測定することにより、残存するトロンビン活性を求めた。この条件下、トロンビンの活性を50%阻害するAT III変異体の濃度 (以下IC50) を算出した。表5に各変異体のIC50値を示した。ヘパリン非存在下におけるヒトAT III濃縮製剤のIC50値は $13.0 \times 10^{-9}M$ であり、天然型組換えAT IIIもほぼ同じ値を示した。これに対し、本発明のAT III変異体のIC50値は明らかに低い値を示し、ヘパリン非存在下の抗トロンビン活性の上昇が認められた。

【0034】

【表5】

ATⅢ変異体の抗トロンビン活性

検体名	抗トロンビン活性 $IC_{50} \times 10^{-8}$ (M)	検体名	抗トロンビン活性 $IC_{50} \times 10^{-8}$ (M)
ATⅢ濃縮製剤	13.0		
天然型組換えATⅢ	14.0		
1R	3.0		
5R	1.7	38R	6.1
26R	3.1	9R	5.8
27R	8.2	19R	8.7
28R	2.8	24R	10.0
29R	1.8	2R'	3.8
30R	2.3	5R'	4.7
46R	5.0	1G1R	3.7
39R	5.6	1G5R	2.9
40R	3.1	2G1R	3.8
48R	5.7	2G5R	2.9
49R	5.6	2G30R	1.6
50R	3.0	2G35R	2.2
7R	2.9	7G5R	1.8
34R	3.5	9G5R	1.7
35R	3.5	127G5R	1.5

【0035】(2) ヘパリン親和性

高速液体クロマトグラフィ法によって、ヘパリン-5PW (7.5mm × 75mm: 東ソウ) を用いて、本発明のATⅢ変異体について、ヘパリンに対する親和性の強さを比較検討した。すなわち、移動相に50mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を用い、流速1ml/minで30分間に塩化ナトリウム濃度を0M から2M 濃度まで直線的に上昇させた。検出は、波長280nmの吸収で行い、検体が溶出されてくるまでの時間で比較した。表6に示したように、ヒトATⅢ及び天然型組換えATⅢの主ピークが溶出

されるまでの時間は22.3分と23.1分であり、大きな差は認められなかった。また、反応部位近傍の変異体においてもヒトATⅢおよび天然型組換えATⅢと比較して顕著な差は認められなかった。一方、反応部位近傍とヘパリン結合部位の両部位変異体については、いずれも主ピークが溶出されるまでの時間が有意に短縮しており、ヘパリン結合部位の変異を導入することによりヘパリンに対する親和性が低下することが確認された。

【0036】

【表6】

AT III変異体のヘパリン親和性 (ヘパリンカラムからの溶出時間)

検体名	溶出時間 (分)	検体名	溶出時間 (分)
AT III濃縮製剤	22.3		
天然型組換えAT III	23.1		
5R	21.4	9R	22.5
26R	21.2	19R	23.2
28R	22.5	24R	23.4
29R	21.0	5R'	23.6
30R	20.4	1G1R	14.0
46R	17.4	1G5R	14.3
40R	21.0	2G1R	12.5
48R	21.6	2G5R	12.9
7R	21.9	2G30R	13.0
35R	22.1	2G35R	13.1
38R	21.9	7G5R	12.9
		127G5R	10.2

【0037】 (3) AT III変異体の抗血栓作用
 血漿由来AT III濃縮製剤 (アンスロビンP、ヘキスト
 ジャパン社) および天然型組換えAT IIIを対照とし
 て、本発明のAT III変異体の抗血栓作用を以下のよう
 に測定した。方法は Peters ら (Peters, R. F. et al.,
 Thromb. Haemostas., 65, 268, 1991) の報告に改良
 を加えて行った。すなわち、麻酔したSprague-Dawley系
 雄ラット (200 ~ 300g) の頸動静脈に生理食塩液を満た
 したアトム静脈カテーテル (4Fr, 3.5cm、アトム社) を
 カニューレションし、shunt を作製した。血流を遮断し
 た状態で shuntの動脈側に脈波ピックアップ (MPP-3、

日本光電) を装着し、血流の変化をポリグラフ記録計で
 実験中モニターした。計算量の検体材料を1mlになるよ
 うに生理食塩液で希釈して同ラットの大腿静脈より単回
 急速投与した後、shunt を開いて血流を開通させた。sh
 unt を開いてから、shunt 内に血栓が形成されて閉塞す
 るまでの時間を測定し閉塞時間とした。結果を表7およ
 び表8に示す。これにより本発明のAT III変異体は血
 漿由来AT III濃縮製剤および天然型組換えヒトAT I
 IIに比較して強い抗血栓作用を有することが判明した。

【0038】

【表7】

A T III変異体の抗血栓作用

検体名	投与量 (mg/kg)	閉塞時間 Mean±SD (分)		例数
生理食塩液		21.4±	2.7	11
A T III濃縮製剤	8	29.1±	8.0	9
	16	36.4±	11.6	8
	32	46.6±	14.3	8
天然型組換えA T III	16	39.3±	10.5	6
	32	49.0±	13.7	4
5 R	8	46.0±	18.6	7
	16	65.7±	21.0	6
30 R	4	35.3±	7.1	6
	8	43.6±	4.7	6
	16	52.2±	5.3	6
35 R	2	34.7±	5.8	7
	4	39.9±	9.4	7
	8	61.4±	12.6	7
1 G 5 R	4	34.1±	8.7	8
	8	45.2±	10.1	6
	16	69.0±	25.7	6
2 G 5 R	4	45.7±	7.5	7
	8	53.6±	9.3	9
	16	70.6±	11.5	8
2 G 30 R	4	35.5±	5.5	6
	8	45.7±	11.2	6
	16	53.8±	13.7	6
2 G 35 R	2	43.8±	6.6	6
	4	45.2±	5.8	6
	8	62.7±	28.2	6

A T III変異体の抗血栓作用

検体名	投与量 (mg/kg)	閉塞時間 Mean±SD (分)	例数
1 F 5 R	4	38.3±6.0	6
	8	41.3±7.1	6
	16	54.7±13.1	6
2 F 5 R	4	39.5±6.1	6
	8	47.8±9.5	6
	16	59.8±16.1	6
3 F 5 R	4	38.5±6.3	6
	8	45.3±5.2	6
	16	55.7±4.5	6
7 G 5 R	4	36.5±5.1	6
	8	39.7±3.9	6
	16	54.2±18.3	6
9 G 5 R	2	38.3±2.7	6
	4	38.5±3.1	6
	8	49.2±2.8	6
1 2 G 5 R	2	36.5±6.0	6
	4	43.7±2.7	6
	8	51.2±6.3	6
1 2 7 G 5 R	2	36.0±7.4	6
	4	46.8±4.4	6
	8	57.0±10.9	6

【0040】以上の結果から、本発明のA T III変異体は血液凝固阻止剤として血栓形成を抑制し、血栓性疾患の予防治療薬として期待される。

【0041】(4) A T III変異体の実験的汎発性血管内凝固症(DIC)モデルにおける効果

血漿由来A T III濃縮製剤を対照として、本発明のA T III変異体の実験的汎発性血管内凝固症(DIC)モデルにおける効果を以下のように検討した。方法は、杉島らの報告(杉島忠志ら, 臨床と研究, 62, 274, 1985)に改良を加えて行った。すなわち、麻酔したSprague-Dawley系雄性ラット(200~300g)の頸静脈にアトム

静脈カテーテル(3Fr, アトム社)をカニューレーションし、組織トロンボプラスチン(トロンボレルS, ペーリングベルケ社)を1時間かけて持続投与することによって、モデルを作製した。試験検体は、組織トロンボプラスチンの投与を開始する直前に同ラットの大腿動脈より単回急速投与した。組織トロンボプラスチン投与終了30分後に、下行大動脈より3.8%クエン酸ナトリウムを1/10量加えて採血した。採血後、直ちに血液0.5mlを自動血球数装置用採血容器(東亜医用電子株式会社)に分取し、TECHNICON社H-1 Systemにて血小板数を測定した。残りの血液より遠心分離(3000rpm 10min)にて血

漿を得て、血漿中のフィブリノーゲン量を測定した。血漿中フィブリノーゲン量は、トロンビン時間法（フィブリノーゲンB-テストワコー、和光純薬）にて測定した。結果を表9に示す。これより本発明のAT III変異体は、組織トロンボプラスチン誘発の実験的DICモデルにおいて、血小板数の減少および血漿中フィブリノー

ゲン量の低下に対して、血漿由来AT III濃縮製剤に比較して強い効果を示すことが判明した。以上の結果から、本発明のAT III変異体はDIC治療剤として期待される。

【0042】

【表9】

AT III変異体の実験的DICモデルにおける効果

検体名	投与量 (mg/kg)	例数	血小板数 ($\times 10^3/\mu l$) Mean \pm SD	血漿中フィブリノーゲン量 (g/l) Mean \pm SD
生理食塩液 (組織トロンボプラスチン 非投与)		12	952.7 \pm 110.6	1.95 \pm 0.15
組織トロンボプラスチン 単独投与		12	424.1 \pm 122.3	0.12 \pm 0.03
AT III濃縮製剤	8	12	527.0 \pm 108.8	0.17 \pm 0.06
	16	11	596.6 \pm 60.9	0.20 \pm 0.07
	32	12	683.7 \pm 128.9	0.77 \pm 0.41
1G5R	4	6	574.7 \pm 54.2	0.36 \pm 0.42
	8	6	729.7 \pm 77.6	0.99 \pm 0.54
2G5R	4	6	618.5 \pm 116.1	0.21 \pm 0.07
	8	6	618.2 \pm 146.3	0.77 \pm 0.28
1F5R	4	6	557.2 \pm 154.4	0.30 \pm 0.34
	8	6	649.5 \pm 112.6	0.64 \pm 0.39
2F5R	4	6	528.8 \pm 89.1	0.24 \pm 0.08
	8	5	659.8 \pm 53.6	0.63 \pm 0.24
3F5R	4	6	487.3 \pm 83.4	0.16 \pm 0.08
	8	6	664.5 \pm 61.5	0.54 \pm 0.37

【0043】このAT III変異体は経口的、局所的、静注的、もしくは筋注的、皮下注的などにより投与することができるが、局所もしくは静注投与が好ましい。投与

量は0.1～100mg/kg、好ましくは0.5～20mg/kgであり、体重に応じて1～50mlの生理食塩水に溶解して用いる。また製剤の形としては、水和剤、水溶剤、錠剤、カ

ブセル剤、粉剤、座剤などが使用でき、これら製剤の担体としては薬学的に許容される賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、分散剤など通常の医薬品に使用されているものが用いられる。

【0044】

【実施例】以下の実施例により本発明を詳細に且つ具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0045】実施例1

ヒトAT IIIをコードするDNA配列のクローニング
市販のヒト肝臓cDNAライブラリー（λgt 11、クローニング社）を原料として、常法に従いプローブとして³²P標識合成オリゴヌクレオチドを用いてスクリーニングした。合成オリゴヌクレオチドの配列はChandraらの報告をもとに、AT IIIの314位から322位のアミノ酸に対応する塩基配列部分とした。スクリーニングの結果、#2および#6という2種のクローンが得られた。それぞれのクローンより制限酵素EcoRIにてDNA断片を回収しM13mp18にサブクローニングし塩基配列を決定したところ、#2のクローンは33番目のアミノ酸に対応する配列からpolyAまでの約1.3kbを含み、一方#6のクローンは翻訳開始コドンから348番目のアミノ酸に対応する約1.1kbを含むことが確認された。次にこれらのクローンよりEcoRIにてインサートを切り出し、それぞれEcoRIにて切断したpUC18にサブクローニングした。このようにして#2のクローンよりpUC-Hを、#6のクローンよりpUC-Lを作製した。次いでpUC-LをNcoIおよびHind IIIで切断し生じた約3.7kbのDNA断片（pUC18およびアンチトロニンIIIのN末側に対応する約1.0kbの配列を含む）と、pUC-Hを同じくNcoIおよびHind IIIで切断し生じた約0.5kbのDNA断片（アンチトロニンIIIのC末側に対応する配列を含む）を結合し、AT IIIの翻訳開始コドンより終始コドンまでの全コーディング配列を含むAT III FLpUCというプラスミドを得た。このプラスミドに含まれるAT III cDNAの開始コドンから終始コドンまでの全配列を配列番号1に示した。

【0046】実施例2

制限酵素切断部位の導入

実施例1で得られたプラスミドAT III FLpUCを材料としてAT IIIコーディング配列の直前に制限酵素Hind III切断部位、直後に制限酵素BglII切断部位を導入したDNAを作製した。まず初めにAT III FLpUCをEcoRIにて切断し、AT III全コーディング領域を含む約1.5kbの断片を得た。この断片を先に述べたM13tv18のRFをEcoRIにて切断し開環したものに導入した。こうして得られたクローンのうちAT IIIのセンス鎖を一本鎖DNAとして与えるクローンをtvATRとした。次のこのtvATRの一本鎖DNAを鋳型とし、各酵素の切断部位をそれぞれ含む下記2種の合成オリゴヌクレオチドをプ

ライマーとして、Kramerらの方法に従い制限酵素切断部位を導入した。

【0047】

AT5H 25mer

5' TACATGGCCGAAGCTTCGTAATCAT 3'

AT3B 29mer

5' CAAAGAATAAGATCTTATTACTTAAACACA 3'

実際の操作は市販のキット（宝酒造、Mutan G）を用いた。すなわち約0.5μgのtvATRの一本鎖DNAと0.2μgのキット添付dsDNA（M13mp18のマルチクローニングサイトを含むPvuII断片を欠失させたファージM13mp PのRF DNAをPvuIIで切断し直鎖化したもの）を20mM Tris・HCl pH8-10mM MgCl₂-50mM NaCl-1mM DTT中100℃3分間、65℃10分間、37℃10分間静置しgapped duplexを形成させた。この1/10量を取り、T4ポリヌクレオチドキナーゼにて5'端をリン酸化したAT5H、AT3B各5pmolと混和し（計3μl）65℃15分間、37℃15分間静置した。これにキット添付の緩衝液（50mM Tris・HCl pH8-60mM酢酸アンモニウム-5mM MgCl₂-5mM DTT-1mM NAD⁺-0.5mM each dNTPs（A, C, G, T）25μl、60UのE.coli DNAリガーゼ、1UのT4DNAポリメラーゼを加え25℃約2時間静置した。3μlの0.2M EDTA pH8を加え65℃5分間加熱したのち一部を取りHanahanの方法（Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166, 557, 1983）によって調製した大腸菌BMH71-18mutS株のコンピテントセルにトランスフェクションした。大腸菌MV1184株を指示菌として得られたプラークを拾い、常法に従い培養しRF DNAを調製した。このDNAを制限酵素Hind IIIおよびBglIIにて切断し、新たな切断部位が生じているクローンにつきダイデオキシ法にて塩基配列を決定し、目的とする変異が導入されていることを確認した。こうして得られたクローンをAT5H3Bとした。

【0048】このAT5H3BをHind IIIおよびEcoRIによって切断し得られる約1.5kbのDNA断片を、やはりHind IIIおよびEcoRIにて切断し、開環したM13tv19RFに挿入したクローンをtv19-5H3Bとした。またプラスミドpSV2-dhfr（Lee, F. et al., Nature, 294, 228, 1981; Subramani, S. et al., Mol. Cell. Biol., 1, 854, 1981）をHind IIIおよびBglIIにて切断しマウスジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）をコードする領域を除いたDNA断片と、AT5H3BをやはりHind IIIとBglIIにて切断して得た、AT IIIの全コーディング配列を含むDNA断片とを結合しプラスミドpSV2-5H3Bを得た。さらにpSV2-5H3BをHind IIIおよびSacIにて切断して得たAT IIIのN端側をコードする約730bpのDNA断片を、やはりHind IIIおよびSacIにて切断し開環したM13tv19、およびM13mp19に導入してそれぞれtv19-ATN、mp19-ATNとした。

【0049】実施例3

a) 1R変異体DNAの作製

AT IIIの 392番目の Glyを Proで置換したAT III変異体1R(表3)をコードする配列を部位特異的変異導入法によって得た。すなわち、実施例2で得られたAT5H3Bの一本鎖DNAを鋳型としてKramerらの方法に従って、合成オリゴヌクレオチドAT1R(表1)を作用させることによって目的とするクローン 1Rmutを得た。操作は市販のキット(Mutan G)を用いて、実施例2に記載した方法と同様に行った。得られたプラークを12個拾って解析したところ、5個が目的とするクローンであった。得られたクロンのRFDNAをHind IIIおよびBglIIにて切断し生じた約1.4kbのDNA断片を実施例2と同様プラスミド pSV2-dhfr中のマウスDHFR遺伝子と入れ換えプラスミド pSV2-1Rを構築した。

【0050】b) 他の反応部位近傍変異体DNAの作製1R以外の反応部位近傍への変異導入は実施例2で得られた tv19-5H3Bを鋳型として上述のKramerらの方法に従って行った。この方法で5R、26R、28R、29R、30R、39R、40R、46R、48R、49R、50R、27R、7R、34R、35R、38R、9R、19R、24R、2R'、5R'、6R'の変異を導入した。それぞれのAT III 変異体の反応部位近傍のアミノ酸配列を表3に、変異導入に使用した合成オリゴヌクレオチドの配列を表1および表2に示す。操作は実施例2と同様にキット添付のマニュアルに従い変異導入反応を行ったのち得られたクローンを数個拾い、塩基配列を確認し目的とする変異が導入されたクローンを得た。それぞれのクローンより Hind III、Bgl IIにて約1.4kbのDNA断片を得て、5R、26R、28R、30R、27R、7R、19R、24R、2R'、5R'、6R'については実施例2および3a)と同様 pSV2-dhfrのマウスDHFR遺伝子と入れ換え、それぞれプラスミド pSV2-5R、pSV2-26R、pSV2-28R、pSV2-30R、pSV2-27R、pSV2-7R、pSV2-19R、pSV2-24R、pSV2-2R'、pSV2-5R'、pSV2-6R'とした。また39R、40R、46R、48R、49R、50R、34R、35R、38RについてはそれぞれのDNA断片を後述のプラスミド pK4K中のNKAF遺伝子の一部と入れ換え、それぞれプラスミド pK4K-39R、pK4K-40R、pK4K-46R、pK4K-48R、pK4K-49R、pK4K-50R、pK4K-34R、pK4K-35R、pK4K-38Rとした。なお29R、9Rについてはプラスミド pSV2-29R、pSV2-9RよりHind IIIおよびBglIIにて約1.4kbのDNA断片を再び単離し、同様にプラスミド pK4K-29R、pK4K-9Rを構築した。

【0051】実施例4

ヘパリン結合部位変異体DNAの作製

ヘパリン結合部位の変異のうち1G、2G、8Gの変異導入は実施例2で得られた tv19-5H3Bを鋳型としてKramerらの方法に従って行った。用いた合成オリゴヌクレオチドの配列は表2に示す。目的とする変異が導入されたクローンをそれぞれ 1Gmut、2Gmut、8Gmut とした。これらのクローンより Hind III、Bgl IIにより約1.4kbのDNA断片を切り出し、反応部位の変異の場合と同様にプラ

スミド pSV2-1G、pSV2-2G、pSV2-8G を得た。また pSV2-1Gを Hind III および Sac I により切断し得られる約730bpのDNA断片を、同じ酵素で切断した M13tv19に導入し tv19-1GN とした。1F、2F、3F、7Gの変異導入は実施例2で得られたtv19-ATNを鋳型として同様に行った。目的とする変異が導入された M13クローンをそれぞれ 1Fmut、2Fmut、3Fmut、7Gmut とした。

【0052】9Gの変異導入は mp19-ATN を鋳型として Vandeyar らの方法にて行った。実際の操作はキット(USB社; T7-GEN In vitro mutagenesis system)添付のマニュアルに従った。初めに1μgのmp19-ATN一本鎖DNAと、T4ポリヌクレオチドキナーゼにて5'端をリン酸化した合成オリゴヌクレオチド AT9G 2pmol を40mM Tris-HCl pH7.5-20mM MgCl₂-50mM NaCl中65℃5分間加熱後、室温となるまで徐冷した。次にこの反応液(10μl)に10X Synthesis mix (100mM Tris-HCl pH7.5-20mM DTT-5mM dATP-5mM dGTP-5mM dTTP-5mM 5-Methyl-dCTP-10mM ATP)を2μl、2.5UのT7DNAポリメラーゼ、5UのT4DNAリガーゼを加え最終液量20μlとして37℃1時間静置した。この操作により変異の導入された鎖のみメチル化されたRFDNAが合成される。反応液を70℃10分間加熱して酵素を失活させたのち制限酵素MspIおよびHhaIを各5U加え37℃45分間反応させた。この操作でMspIにより二本鎖DNAのうち鋳型としてメチル化されていないDNA鎖にのみ切れ込みが入るとともに二本鎖DNAに変換されなかった鋳型の一本鎖DNAがHhaIにより切断される。次にこの反応液に50UのエキソヌクレアーゼIIを加え37℃45分間反応させることによって、切れ込みの入った鋳型鎖のみが分解され、結果として変異が導入されたDNA鎖が濃縮される。70℃10分間加熱し反応を止めた後、メチル化されたDNAに特異的な制限システムを持たない(mcrAB)大腸菌SDM株に常法でトランスフェクションした。得られたプラークを数個拾いDNAを得て塩基配列を決定することによって、目的とする変異の導入されたクローンを選択した。こうして得られたクローンよりHind IIIおよびSacIにて約730bpのDNA断片を単離し、同じ酵素にて切断して同サイズの断片を除いた pSV2-5H3Bに導入して pSV2-9Gとした。

【0053】12Gの変異は1Gの変異が導入されているDNAを鋳型としてAT2Gの合成オリゴヌクレオチド(表2)によってさらに変異を導入することによって得た。すなわちtv19-1GNを鋳型としてKramerらの方法によって行った。目的とする変異が導入されていることを確認したクローンを12Gmutとした。127Gの変異は12Gmutの一本鎖DNAを鋳型として、前記のVandeyarらの方法によって合成オリゴヌクレオチドAT7Gを作用させることによって得た。はやり目的とする変異が導入されていることを確認したクローンを127Gmutとした。

【0054】実施例5

反応部位近傍とヘパリン結合部位の両部位変異体DNA

の作製

a) 1G5R変異体DNAの作製

ヘパリン結合部位の変異1Gに反応部位近傍の変異5Rを組み合わせた1G5R変異体のDNAは以下のように作製した。実施例4で得られた1GmutのRFDNAをHind IIIおよびSac Iにて切断し、約730bpのヘパリン結合部位に変異を含むDNA断片を調製した。また実施例3で得られたpSV2-5RをSac IおよびBgl IIにて切断し、約670bpの反応部位近傍に変異を含むDNA断片を調製した。これらDNA断片を組み合わせ、Hind IIIおよびBgl IIにてマウスDHFR遺伝子を除去したpSV2-dhfrに導入してpSV2-1G5Rを作製した。さらに、このpSV2-1G5RをHind IIIおよびBgl IIにて切断し生じた約1.4kbのDNA断片を、後述のプラスミドpK4KをHind IIIおよびBamHIにて切断しNKAF遺伝子の一部を除去したものに導入し、pK4K-1G5Rを作製した。これら変異を含むDNA断片の調製および両変異DNA断片の組み合わせによるpSV2-1G5RおよびpK4K-1G5Rの構築は公知の方法に準じて行った。プラスミドpK4K-1G5Rを含有する大腸菌(*Escherichia coli*) HB101-pK4K-1G5Rは、通産省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託された(受託番号 FERM BP-3806)。

【0055】b) 2G5R変異体DNAの作製

ヘパリン結合部位の変異2Gに反応部位近傍の変異5Rを組み合わせた2G5R変異体のDNAは以下のように作製した。実施例4で得られた2GmutのRFDNAをHind IIIおよびSac Iにて切断し、約730bpのヘパリン結合部位に変異を含むDNA断片を調製した。また実施例3で得られたpSV2-5RをSac IおよびBgl IIにて切断し、約670bpの反応部位近傍に変異を含むDNA断片を調製した。これらDNA断片を組み合わせ、Hind IIIおよびBgl IIにてマウスDHFR遺伝子を除去したpSV2-dhfrに導入してpSV2-2G5Rを作製した。さらに、このpSV2-2G5RをHind IIIおよびBgl IIにて切断し生じた約1.4kbのDNA断片を、後述のプラスミドpK4KをHind IIIおよびBamHIにて切断しNKAF遺伝子の一部を除去したものに導入し、pK4K-2G5Rを作製した。プラスミドpK4K-2G5Rを含有する大腸菌(*Escherichia coli*) HB101-pK4K-2G5Rは、通産省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託された(受託番号 FERM BP-3807)。

【0056】c) 他の両部位変異体DNAの作製

実施例3および4で得られた各部位変異体DNAを用いた。ヘパリン結合部位の変異を含むDNA断片として、pSV2-1G、pSV2-2G、pSV2-9G 1Fmut, 2Fmut, 3Fmut, 7Gmut, 12Gmut, 127GmutをそれぞれHind IIIおよびSac Iにて切断して生じた約730bpのDNA断片を用意した。また反応部位の変異を含むDNA断片としてpSV2-1R、pSV2-5R(あるいはpSV2-1G5R)およびpSV2-30RをSac IおよびBgl IIにて切断して約670bpのDNA断片を得た。さらにpK4K-35RをSac IおよびXhoIIにて切断し

同じく約670bpのDNA断片を得た(pK4KをHind IIIおよびBamHIにて切断しNKAF遺伝子の一部を除去したプラスミドに、AT III変異体遺伝子をHind III-Bgl II断片として導入したDNAでは、Bgl II切断端とBamHI切断端とが連結される結果、再度Bgl IIにて切断することができない。しかしこの部位はXhoIIにて切断可能である)。以上示したDNA断片を組み合わせ、pK4KをHind IIIおよびBamHIにて切断しNKAF遺伝子の一部を除去したプラスミドに導入することによってpK4K-1G30R、pK4K-1G35R、pK4K-2G30R、pK4K-2G35R、pK4K-1F5R、pK4K-2F5R、pK4K-3F5R、pK4K-7G5R、pK4K-7G30R、pK4K-7G35R、pK4K-9G5R、pK4K-9G30R、pK4K-9G35R、pK4K-12G5R、pK4K-12G30R、pK4K-12G35R、pK4K-127G5R、pK4K-127G30R、pK4K-127G35Rを構築した。またHind IIIおよびBgl IIにてマウスDHFR遺伝子を除去したpSV2-dhfrを用いて同様にpSV2-1G1R、pSV2-2G1Rを構築した。

【0057】実施例6

動物細胞用発現ベクターの構築

a) 天然型組換えAT IIIおよび1Rの発現ベクターの構築

組換えナチュラルキラー細胞活性化因子(NKAF)をコードするcDNAを含むプラスミドpNK8308(特開平2-231083明細書に開示)をBgl IIとBamHIで消化しアガロース電気泳動を行って約0.75kbのNKAF cDNA断片を単離した。プラスミドpPCR(0 Hare, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527, 1981)をBamHIで消化した後、アルカリフォスファターゼで脱リン酸して得られたベクターDNAをNKAF cDNA断片とT4 DNA リガーゼを加えて結合させ(ライゲーション) pKCRNKを得た(図1)。

【0058】プラスミドpUC19をPstIで消化した後、常法に従ってT4DNAポリメラーゼで処理し、3'および5'の両末端を平滑末端とし(プラントエンド化)、ライゲーションしてpUC19Pst⁻を得た。次いで、pUC19Pst⁻をBamHIで消化した後アルカリフォスファターゼで脱リン酸して得られたベクターDNAとプラスミドpAdd26SV(A)(no.3)(Kaufmann, R. and Sharp, P., Mol. Cell. Biol., 2, 1304, 1982)をBamHIで消化し、アガロース電気泳動を行って単離した約2.4kbのDNA断片(アデノウイルスプロモーター、マウスジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子、SV40ポリAシグナルを含む)をライゲーションしてpUC19Pst⁻Adを得た(図2)。さらにpUC19Pst⁻AdをPstIで消化し、T4DNAポリメラーゼでプラントエンド化しライゲーションしてpUC19Pst⁻AdPst⁻を得た。そして、pAdd26SV(A)(no.3)をBamHIで消化し、脱リン酸し、アガロース電気泳動を行って単離したテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約2.9kbのDNA断片とpUC19Pst⁻AdPst⁻をBamHIで消化しアガロース電気泳動を行って単離したアデノウイルスプロモーター、マウスDHFR遺伝子、SV40ポリAシグナルを含む約2.4kbのDNA

断片をライゲーションして pAdPst⁻を得た(図3)。pAdPst⁻をEcoRIで消化した後、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメントで処理し、プラントエンド化した。ついで、PstIで消化した後、T4DNAポリメラーゼでプラントエンド化した。これにAat IIリンカーを加えてライゲーションさせ、反応生成物をAat IIで消化し、アガロース電気泳動を行い、アデノウイルスプロモーター、マウスDHFR遺伝子、SV40ポリAシグナルを含む約2.7kbのDNA断片を得た。このDNA断片をpKCRNKをAat IIで消化し、脱リン酸したDNAとライゲーションしてpKCRNKAdを得た(図4)。実施例2で得られたプラスミドpSV2-5H3BをHind IIIとBgl IIで消化し、ヒトAT III c DNAを含む約1.4kbのDNA断片を単離し、プラスミドpIC19R (Marsh, J. L. et al., Gene, 32, 481, 1984)をHind IIIとBgl IIで消化して得られたベクターDNAとライゲーションしてpIC19R5H3Bを得た。次いでpIC19R5H3BをBamHIとBgl IIで消化し、5H3BcDNAを含む約1.4kbのDNA断片を単離し、pKCRをBamHI消化、脱リン酸したベクターDNAとライゲーションしてpKCR5H3Bを得た(図5)。

【0059】pKCRNKAdをAat IIで消化し、アデノウイルスプロモーター、マウスDHFR遺伝子、SV40ポリAシグナルを含む約2.7kbのDNA断片を単離し、pKCR5H3BをAat II消化、脱リン酸したベクターDNAとライゲーションしてpKCR5H3BAdを得た(図6)。pKCR5H3BAdは実施例7に示すように、動物細胞において天然型組換えAT IIIを発現させるために用いた。同様に、実施例3a)で得られたpSV2-1Rを出発材料としてpKCR1RAdを得た。pKCR1RAdは実施例7に示すように、動物細胞において変異体1Rを発現させるために用いた。

【0060】b) 各種変異体の動物細胞での発現用ベクターの構築

pKCR5H3BAdをEcoRI消化した後、セルフライゲーションさせSV40プロモーター、NKAF遺伝子の一部、ウサギβ-グロビン遺伝子の一部を除いたpKCRAdEcoを選択した。pKCRAdEcoをBamHI消化、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメントでプラントエンド化し、ライゲーションして、pKCRAdEcoB⁻を得た。次いでpKCRAdEcoB⁻をHind III消化、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメントでプラントエンド化してライゲーションして、pKCRAdEcoB⁻H⁻を得た(図7)。pKCRNKAdをHind IIIとBamHIで消化し、NKAF遺伝子の一部を含む約0.4kbのDNA断片を単離し、pIC19RをHind IIIとBamHIで消化したベクターDNAとライゲーションしてpIC19RNKKを得た。pIC19RNKKをBgl IIとBamHIで消化し、NKAF遺伝子の一部を含む約0.4kbのDNA断片を単離し、pKCRをBamHI消化、脱リン酸したベクターDNAとライゲーションしてpKNKを得た(図8)。pKNKをEcoRIで部分消化し、SV40プロモーター、NKAF遺伝子の一部、ウサギβ-グロビン遺伝子の一部を含む約1.5kbのDNA断片を単離し、pKCRAd

EcoB⁻H⁻をEcoRI消化、脱リン酸したベクターDNAとライゲーションしてpK4Kを得た(図9)。

【0061】pK4Kは図9に示すごとく、SV40初期遺伝子のプロモーター、SV40の複製開始領域、NKAF遺伝子の一部、ウサギβ-グロビン遺伝子の一部(スプライシングおよびポリAシグナル)、SV40初期遺伝子のポリAシグナル、タイプIIアデノウイルスの主要後期遺伝子プロモーターと5'スプライスシグナル、ウサギγグロブリン3'スプライスシグナル、マウスDHFR遺伝子、SV40初期遺伝子のポリAシグナル、pBR322の複製開始領域およびpBR322由来のβラクターゼ遺伝子(Amp^r)を含み、アデノウイルスの主要後期遺伝子プロモーターの下流にdhfrが接続され、SV40初期遺伝子のプロモーター下流にNKAF遺伝子の一部が接続されている。AT III変異体の遺伝子をpK4KのNKAF遺伝子の一部をHind IIIとBamHIで切り出したあとに挿入することによって動物細胞における発現用ベクターを構築することができる。実際に、変異体1G5Rおよび2G5Rの発現ベクターは実施例5a)、b)に示したように、それぞれpSV2-1G5RおよびpSV2-2G5RとpK4Kを用いて上記の方法により作製し、pK4K-1G5R、pK4K-2G5Rとした。実施例3b)および実施例5c)に示したように、他の変異体についても同様にpK4Kを用いて発現ベクターを構築した。

【0062】c) 変異体5Rおよび7Rの発現ベクターの構築

実施例3b)で得られたプラスミドpSV2-5RをHind IIIとBgl IIで消化して5R遺伝子を含む約1.4kbのDNA断片を単離し、pKNKをHind IIIとBamHIで消化、NKAF遺伝子の一部を除いたベクターDNAとライゲーションしてpKNK5Rを得た。pKNK5RをEcoRI消化し、SV40初期遺伝子のプロモーター、5R遺伝子、ウサギβ-グロビン遺伝子の一部を含む約1.5kbのDNA断片を単離し、pKCRAdEcoB⁻H⁻をEcoRI消化、脱リン酸したベクターDNAとライゲーションしてpKCR5RAdを得た(図10)。同様にして実施例3b)で得られたpSV2-7Rを用いてpKCR7RAdを得た。

【0063】実施例7

AT III変異体の動物細胞による発現

a) CHO細胞による発現

CHO細胞(dhfr欠損株, Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 4216, 1980)を7×10⁵ cells / 5ml / 25cm² 培養フラスコで植え込み、翌日、実施例6a)で得られたプラスミドpKCR1RAd 3 μgをCellPfect (Pharmacia 社製キット)を使ったリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。培地はハムF12培地とダルベッコ変法イーグル培地の1:1混合物(DF培地)に牛胎児血清を10%になるように加えて用いた。3日後、細胞をトリプシン処理し、選択培地(ヒポキサンチンおよびチミジン不含DF培地+10%透析牛胎児血清)で希釈して25cm² 培養フラスコ1本

分の細胞を4枚の培養用24ウェルプレートの各ウェルに1mlずつ分注した。次いで3~4日毎に選択培地にて培地交換を行いながら培養を続行した。これらの条件下で生存する細胞のみがマウスDHFR遺伝子により形質転換を受けた細胞である。約2週間後、生じたコロニーをウェル内でトリプシン処理して分散し、培地を加えてさらに3~4日培養後、培養液を交換し、翌日、培養上清中に含まれる1Rの量をEIA法で測定した。数十ng/ml/day程度以上を発現している個々のクローンを50nMのメソトレキセート(MTX)を含む選択培地に移して2~3週間培養した。さらにMTXの濃度を順次、100nM、400nMおよび1000nMへと上げて同様に培養を続けた。1000nM MTX中で増殖させたクローンのうち発現量の高いものについて96ウェルプレートを用いた限界希釈法によってクローニングを行った。こうして得られた代表的なクローン110-6はコンフルエントに増殖した状態で0.3ml培地/cm²の条件で1日当たり約10μg/mlの1Rを培養上清中に分泌した。同様に実施例6 a)で得たpKCR5H3BAdを用いて、天然型組換えAT IIIを発現するCHO細胞を得た。

【0064】b) BHK細胞による各種変異体の発現

i) pSV2ベクターを使用した場合
プラスミド pSV2-dhfr中のマウスDHFR遺伝子とAT III変異体DNAとを入れ換えることによって構築された、実施例3および実施例5に示したプラスミドは、pSV2-dhfrとともに動物細胞に導入することにより(コトランスフェクション)各変異体の発現のために用いることができる。BHK細胞(tk-ts13株、Waechter, D. E. and Baserga, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1106, 1982)を5×10⁵ cells/5ml/25cm²培養フラスコで植え込み、翌日、実施例3 b)に示した変異体28Rの遺伝子を導入したプラスミドpSV2-28R 7μgをpSV2-dhfr 3.5μgとともにCellPfectを使ったリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。培地はダルベッコ変法イーグル培地に牛胎児血清を5%になるように加えて用いた。3日後、細胞をトリプシン処理し、200nM MTXを含む培地で75cm²培養フラスコに継代した。2~3日毎に培養液を交換し10日間培養を続けた後、100nM MTXを含む培地で175cm²培養フラスコに継代した。さ

らに2~3日毎に培養液を交換し10日間培養した後、96ウェルプレートを用いた限界希釈法によって発現量の高い細胞株をクローニングした。こうして得られたクローン#4はコンフルエントに増殖した状態で0.3ml培地/cm²の条件で1日当たり約0.7μg/mlの28Rを培養上清中に分泌した。実施例3および実施例5に示した、pSV2を用いて作製した他の変異体DNAを含むプラスミドについても同様に発現細胞を得た。

【0065】ii) その他のベクターを使用した場合
BHK細胞(tk-ts13株)を3×10⁵ cells/5ml/25cm²培養フラスコで植え込み、翌日、実施例5 b)で得た2G5R変異体の遺伝子を導入したプラスミドpK4K-2G5R 3μgをCellPfectを使ったリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。培地はダルベッコ変法イーグル培地に牛胎児血清を5%になるように加えて用いた。2日後、細胞をトリプシン処理し、250nM MTXを含む培地で希釈して25cm²培養フラスコで本分の細胞を12枚の培養用24ウェルプレートの各ウェルに分注した。次いで3~4日毎に培地交換を行いながら培養を続行した。12日後、生じたコロニーをウェル内でトリプシン処理して分散し、培地を加えてさらに6日間培養後、培養液を交換し、翌日、培養上清中に含まれる各変異体の量をEIA法で測定し、発現量の高い細胞株をクローニングした。こうして得られたクローン6-5はコンフルエントに増殖した状態で0.3ml培地/cm²の条件で1日当たり約16μg/mlの2G5Rを培養上清中に分泌した。

【0066】実施例6に示したpKCR1RAAd、pKCR5RAAd、pKCR7RAAdおよび実施例3、実施例5に示した、pK4Kを用いて作製した他の変異体DNAを含むプラスミドについても同様に発現細胞を得た。また、実施例6に示したpKCR5H3BAdを用いて同様に天然型組換えAT IIIを発現する細胞を得た。これらの内一部の発現細胞についてはさらに1000nM MTXを含む培地に移して培養した。1000nM MTXを含む培地中で培養させたクローンのうち一部の発現量の高いものについては96ウェルプレートを用いた限界希釈法によってクローニングを行った。こうして得られた代表的なクローンの発現量を表10に示した

【0067】

【表10】

BHK細胞によるATⅢ変異体の発現

変異体名	クローン名	培地中への分泌量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MTX濃度 (nM)
天然型組換えATⅢ	F242	15-20	1000
1R	5-41	25-30	1000
5R	D153	13-15	1000
7R	3-153	20-25	1000
1G5R	11-1	10	1000
6R'	5-21	15	1000
30R	6-18	19	1000
2G5R	6-5	16	250
25R	4-2	20	250
35R	42-5	22	250
29R	22-8	17	250
2G30R	16	19	250
7G5R	1	12	250

培地中への分泌量は、細胞がコンフルエントな状態での培地交換24時間後の変異体濃度で示した(培地量は $0.3\text{ml}/\text{cm}^2$)。

【0068】実施例8

変異体発現細胞の培養および変異体の精製
実施例7で得られたATⅢ変異体発現細胞をローラーボトル(1750cm^2)にて培養した。培地として5%牛胎児血清を加えたダルベッコ変法イーグル培地にMTXを加えたもの(終濃度250nMまたは1000nM)を用いた。300mlの培地に細胞を接種し、 37°C で培養し、培養開始より3~4日後より毎日同量の培地で培地交換し、培養上清を集めた。ATⅢ変異体の精製は、抗ヒトATⅢモノクローナル抗体を担体に結合した抗体カラムによるアフィニティークロマトグラフィーにて行った。すなわちあらかじめ50mM Tris・HCl pH7.5-0.5M NaClにて平衡化した抗体カラムに上記培養上清をチャージし、同上バッファーにて洗浄後、0.2M Glycine・HCl-pH2.5にて溶出した。溶出画分は直ちに1/2容量の1M Tris・HCl pH8.0にて中和した。得られた画分をダルベッコPBS(-)に対して透析後、限外濃縮してその後の実験に供

した。一部の変異体については、抗体カラムの溶出画分を限外濃縮後、セファクリルS-200にチャージし、ダルベッコPBS(-)にてゲルろ過した。得られた活性画分を濃縮後、その後の実験に供した。なお、培養、精製過程でのATⅢ変異体の定量は抗ATⅢ抗体を用いたEIA法にて行った。対照として用いた天然型組換えATⅢについても同様に培養、精製を行った。

【0069】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1395

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

生物名: ホモサピエンス(Homo sapiens)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1..1395

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : 1..96

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 97..1395

特徴を決定した方法 : S

配列

ATG TAT TCC AAT GTG ATA GGA ACT GTA ACC TCT GGA AAA AGG AAG GTT	48
Met Tyr Ser Asn Val Ile Gly Thr Val Thr Ser Gly Lys Arg Lys Val	
-30 -25 -20	
TAT CTT TTG TCC TTG CTG CTC ATT GGC TTC TGG GAC TGC GTG ACC TGT	96
Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ile Gly Phe Trp Asp Cys Val Thr Cys	
-15 -10 -5	
CAC GGG AGC CCT GTG GAC ATC TGC ACA GCC AAG CCG CGG GAC ATT CCC	144
His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro	
1 5 10 15	
ATG AAT CCC ATG TGC ATT TAC CGC TCC CCG GAG AAG AAG GCA ACT GAG	192
Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu	
20 25 30	
GAT GAG GGC TCA GAA CAA AAG ATC CCG GAG GCC ACC AAC CGG CGT GTC	240
Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val	
35 40 45	
TGG GAA CTG TCC AAG GCC AAT TCC CGC TTT GCT ACC ACT TTC TAT CAG	288
Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln	
50 55 60	
CAC CTG GCA GAT TCC AAG AAT GAC AAT GAT AAC ATT TTC CTG TCA CCC	336
His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro	
65 70 75 80	
CTG AGT ATC TCC ACG GCT TTT GCT ATG ACC AAG CTG GGT GCC TGT AAT	384
Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn	
85 90 95	
GAC ACC CTC CAG CAA CTG ATG GAG GTA TTT AAG TTT GAC ACC ATA TCT	432
Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser	
100 105 110	
GAG AAA ACA TCT GAT CAG ATC CAC TTC TTC TTT GCC AAA CTG AAC TGC	480
Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys	
115 120 125	
CGA CTC TAT CGA AAA GCC AAC AAA TCC TCC AAG TTA GTA TCA GCC AAT	528
Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn	
130 135 140	
CGC CTT TTT GGA GAC AAA TCC CTT ACC TTC AAT GAG ACC TAC CAG GAC	576
Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp	
145 150 155 160	
ATC AGT GAG TTG GTA TAT GGA GCC AAG CTC CAG CCC CTG GAC TTC AAG	624
Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys	
165 170 175	
GAA AAT GCA GAG CAA TCC AGA GCG GCC ATC AAC AAA TGG GTG TCC AAT	672
Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn	
180 185 190	
AAG ACC GAA GGC CGA ATC ACC GAT GTC ATT CCC TCG GAA GCC ATC AAT	720
Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn	

195	200	205	
GAG CTC ACT GTT CTG GTG CTG GTT AAC ACC ATT TAC TTC AAG GGC CTG			768
Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu			
210	215	220	
TGG AAG TCA AAG TTC AGC CCT GAG AAC ACA AGG AAG GAA CTG TTC TAC			816
Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr			
225	230	235	240
AAG GCT GAT GGA GAG TCG TGT TCA GCA TCT ATG ATG TAC CAG GAA GGC			864
Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly			
245	250	255	
AAG TTC CGT TAT CGG CGC GTG GCT GAA GGC ACC CAG GTG CTT GAG TTG			912
Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu			
260	265	270	
CCC TTC AAA GGT GAT GAC ATC ACC ATG GTC CTC ATC TTG CCC AAG CCT			960
Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro			
275	280	285	
GAG AAG AGC CTG GCC AAG GTT GAG AAG GAA CTC ACC CCA GAA GTG CTG			1008
Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu			
290	295	300	
CAG GAG TGG CTG GAT GAA TTG GAG GAG ATG ATG CTG GTG GTC CAC ATG			1056
Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met			
305	310	315	320
CCC CGC TTC CGC ATT GAG GAC GGC TTC AGT TTG AAG GAG CAG CTG CAA			1104
Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln			
325	330	335	
GAC ATG GGC CTT GTC GAT CTG TTC AGC CCT GAA AAG TCC AAA CTC CCA			1152
Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro			
340	345	350	
GGT ATT GTT GCA GAA GGC CGA GAT GAC CTC TAT GTC TCA GAT GCA TTC			1200
Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe			
355	360	365	
CAT AAG GCA TTT CTT GAG GTA AAC GAA GAA GGC AGT GAA GCA GCT GCA			1248
His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala			
370	375	380	
AGT ACC GCT GTT GTG ATT GCT GGC CGT TCG CTA AAC CCC AAC AGG GTG			1296
Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val			
385	390	395	400
ACT TTC AAG GCC AAC AGG CCT TTC CTG GTT TTT ATA AGA GAA GTT CCT			1344
Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro			
405	410	415	
CTG AAC ACT ATT ATC TTC ATG GGC AGA GTA GCC AAC CCT TGT GTT AAG			1392
Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys			
420	425	430	
TAA			1395

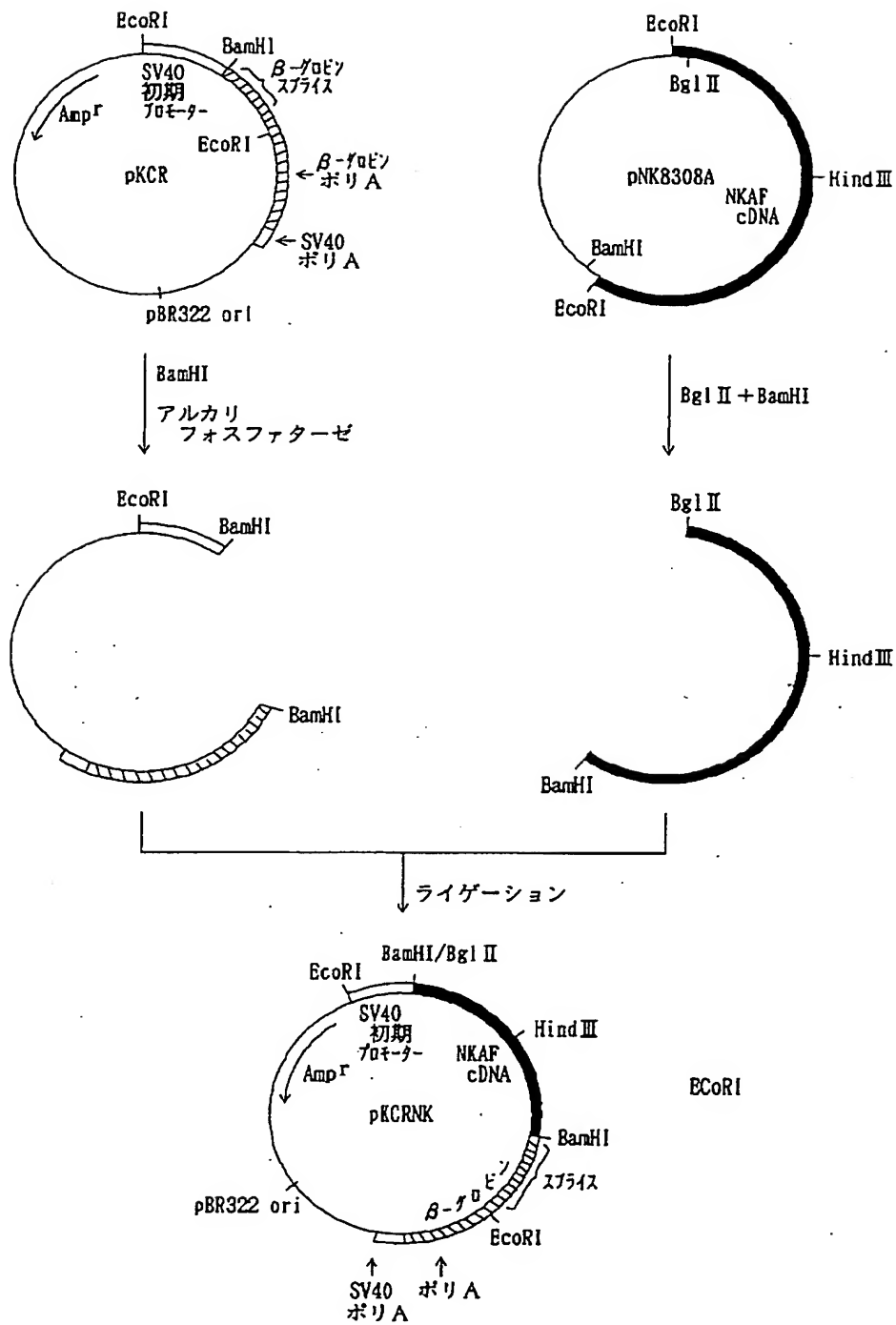
【図面の簡単な説明】

- 【図 1】 pKCRNKの構築図
- 【図 2】 pUC19st⁻Adの構築図
- 【図 3】 pAdPst⁻の構築図
- 【図 4】 pKCRNKAdの構築図
- 【図 5】 pKCR5H3Bの構築図

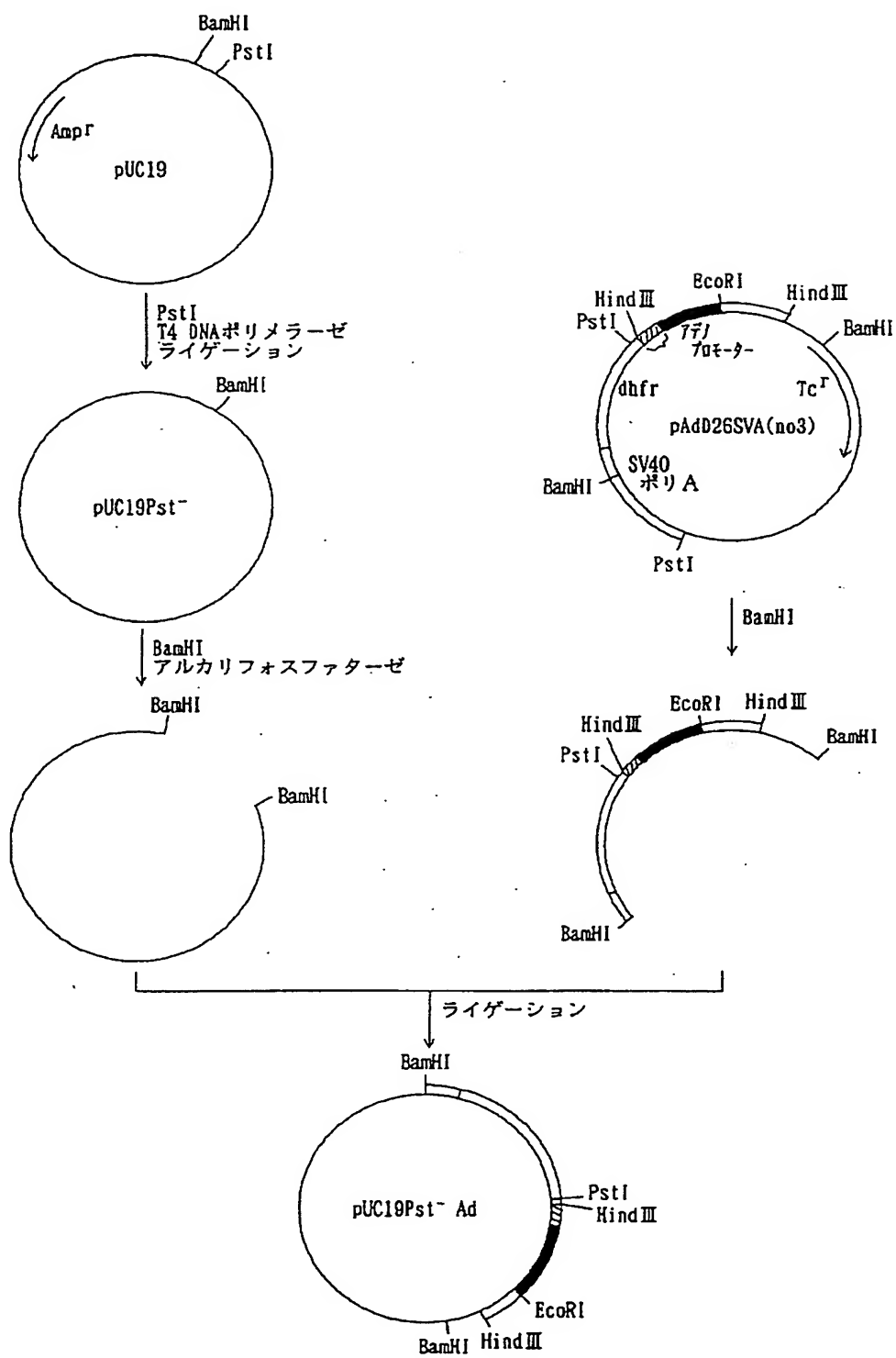
【図 6】 pKCR5H3BAdの構築図

- 【図 7】 pKCRAdEcoB⁻H⁻の構築図
- 【図 8】 pKNKの構築図
- 【図 9】 pK4Kの構築図
- 【図 10】 pKCR5RAdの構築図

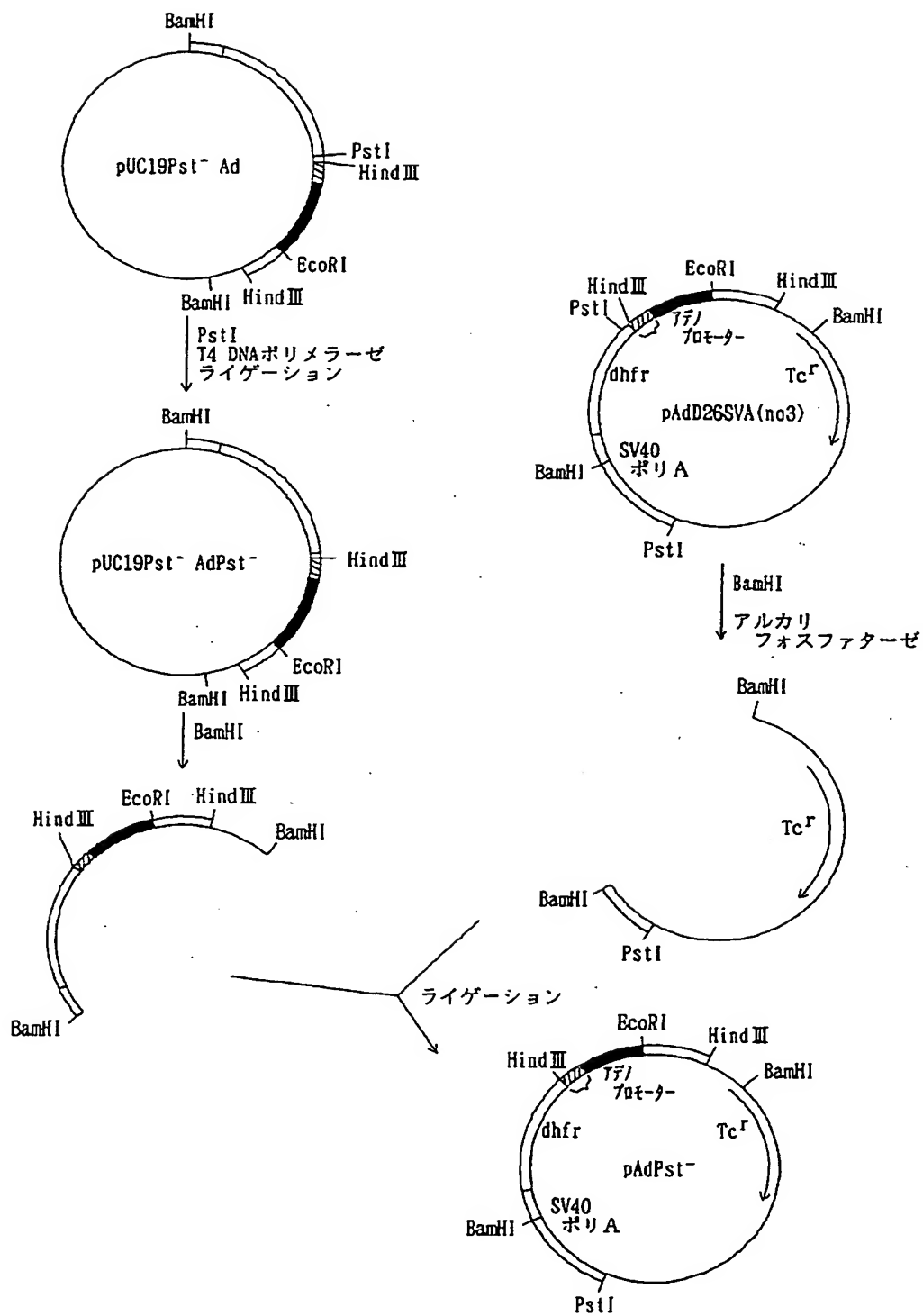
【図1】



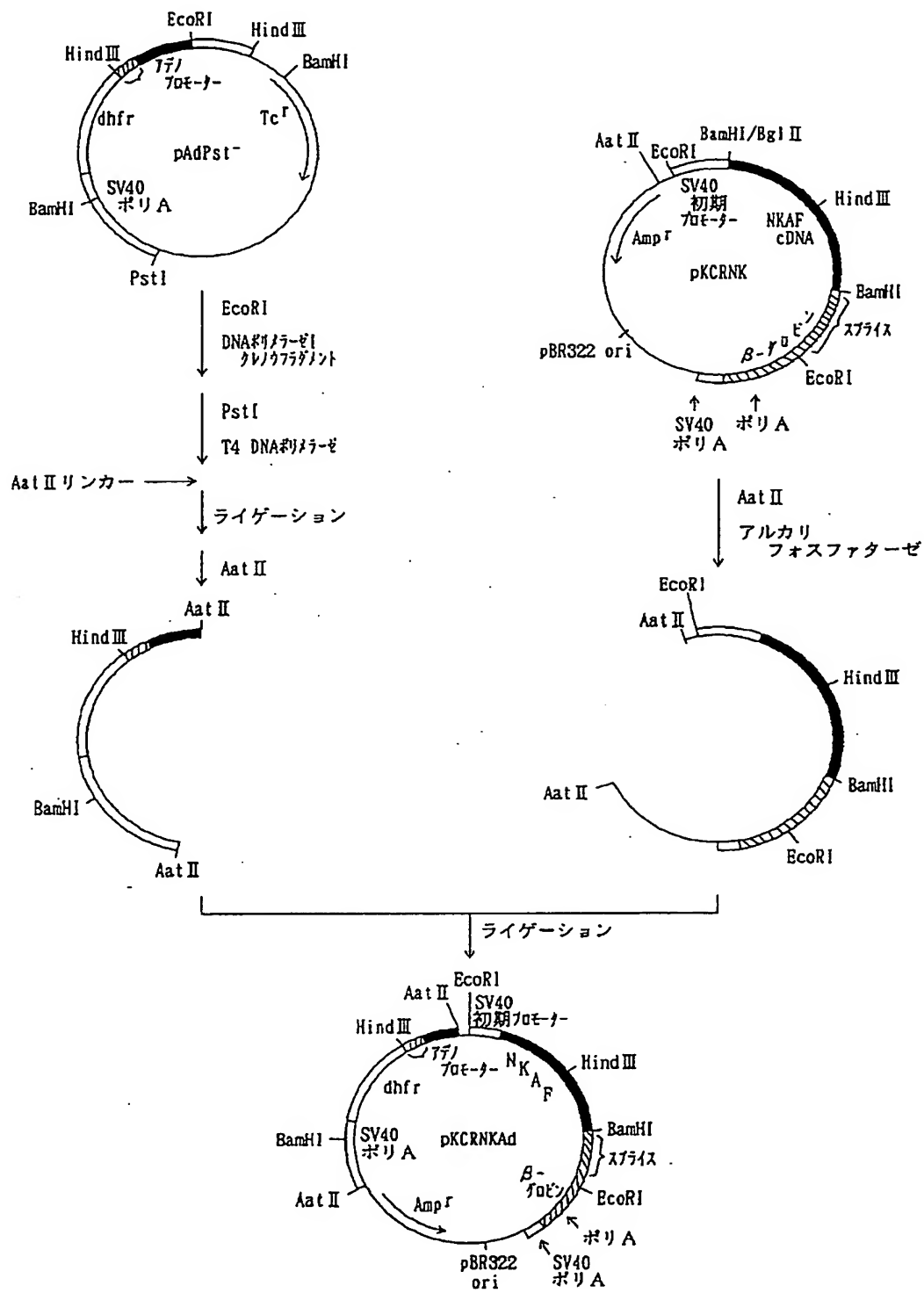
【図2】



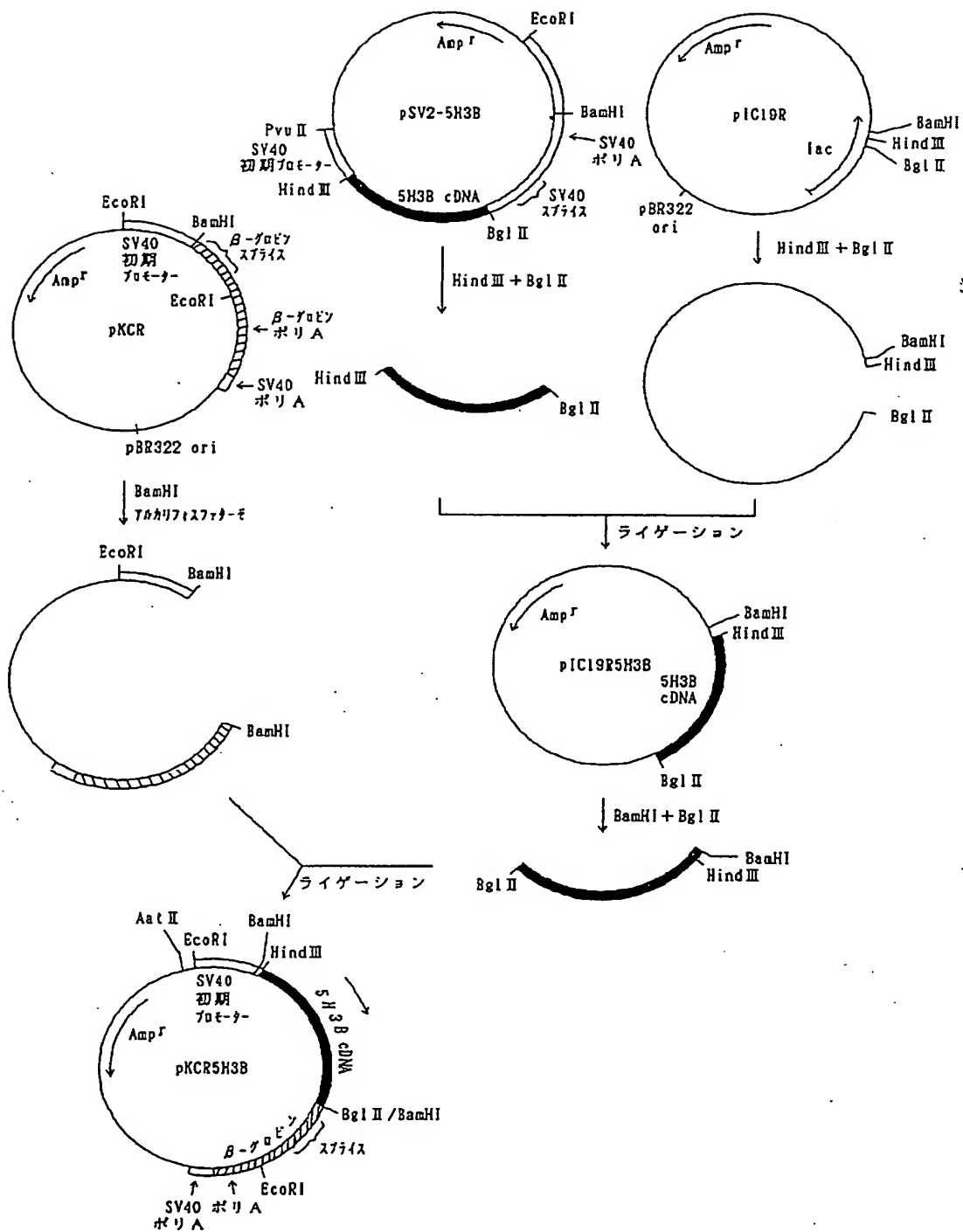
【図3】



【図4】



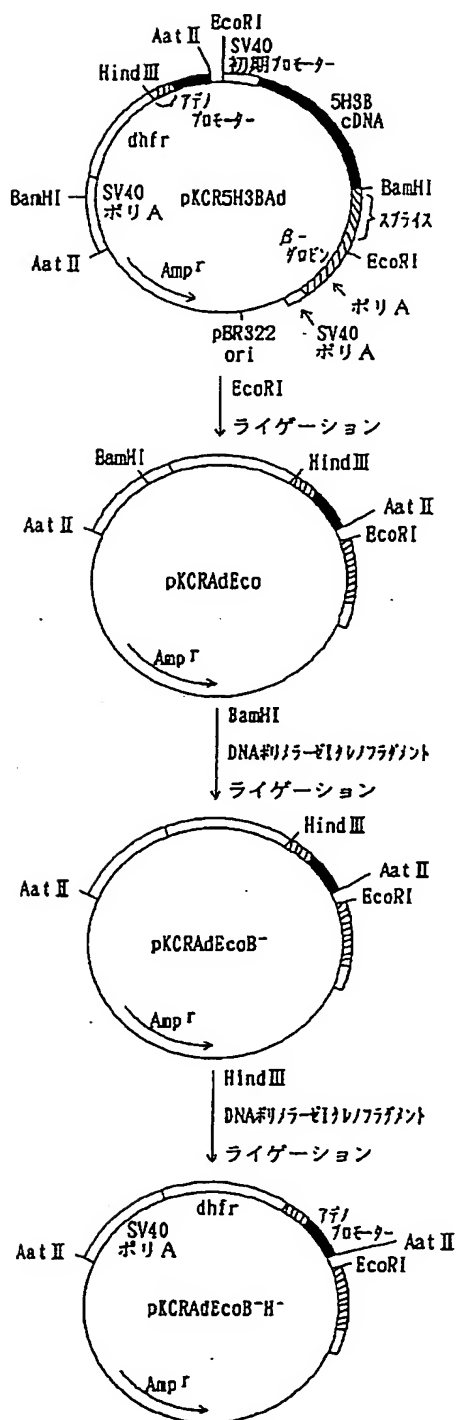
【図5】



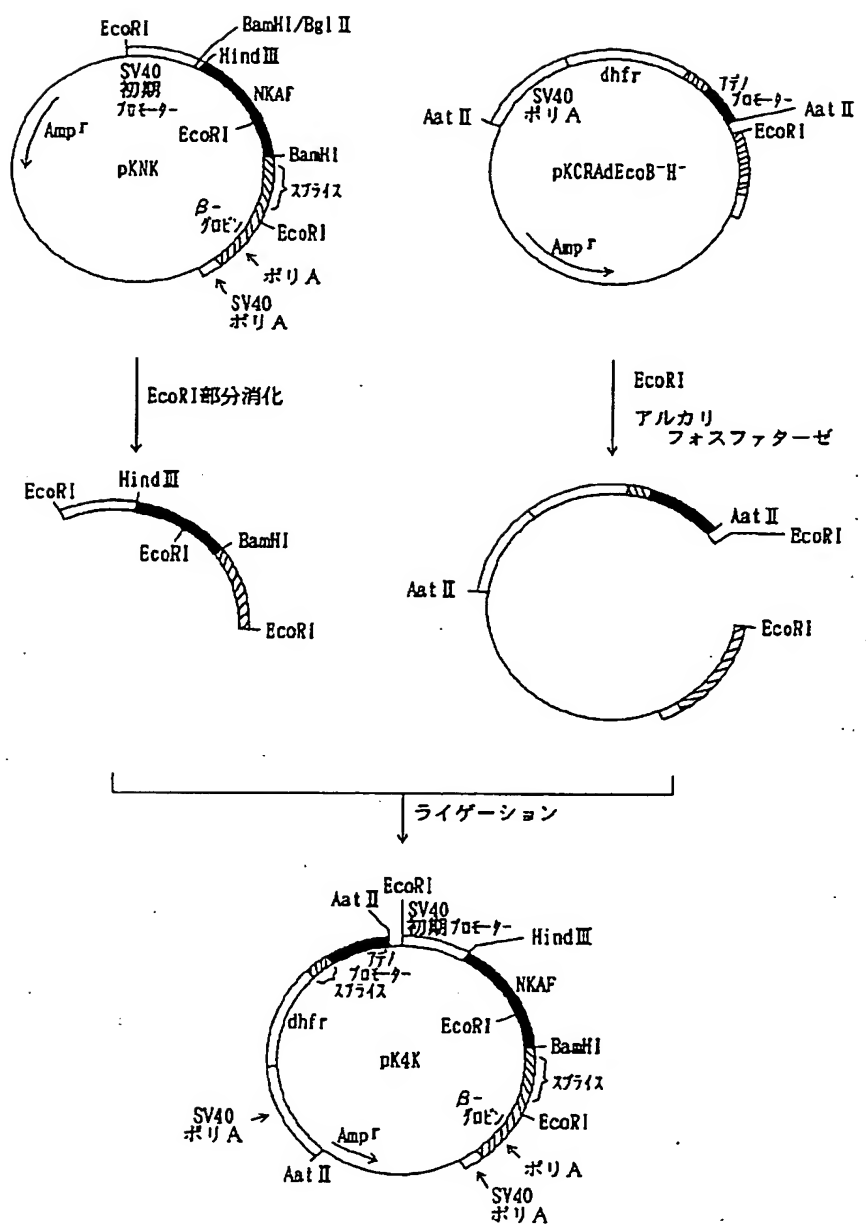
The diagram illustrates the construction of the pKCR5H3BAd vector through a series of steps:

- Parent Plasmids:**
 - pKCRNKAd (Left):** A circular plasmid containing the SV40 early promoter, *dhfr*, SV40 polyA, *Amp^r*, pBR322 ori, and a BamHI site. It is also labeled with Aat II, Hind III, and EcoRI sites.
 - pKCR5H3B (Right):** A circular plasmid containing the SV40 early promoter, *Amp^r*, 5H3B cDNA, SV40 polyA, and a BamHI site. It is also labeled with Aat II, EcoRI, BamHI, Hind III, and Bgl II/BamHI sites.
- Digestion:** Both plasmids are digested with Aat II, resulting in linear fragments.
- Ligation (ライゲーション):** The fragments from both plasmids are ligated together to form the final pKCR5H3BAd vector.
- Final Vector (pKCR5H3BAd):** A circular plasmid containing all the elements from both parent plasmids: SV40 early promoter, *dhfr*, SV40 polyA, *Amp^r*, pBR322 ori, 5H3B cDNA, and a BamHI site. It is also labeled with Aat II, EcoRI, BamHI, Hind III, and Bgl II/BamHI sites.

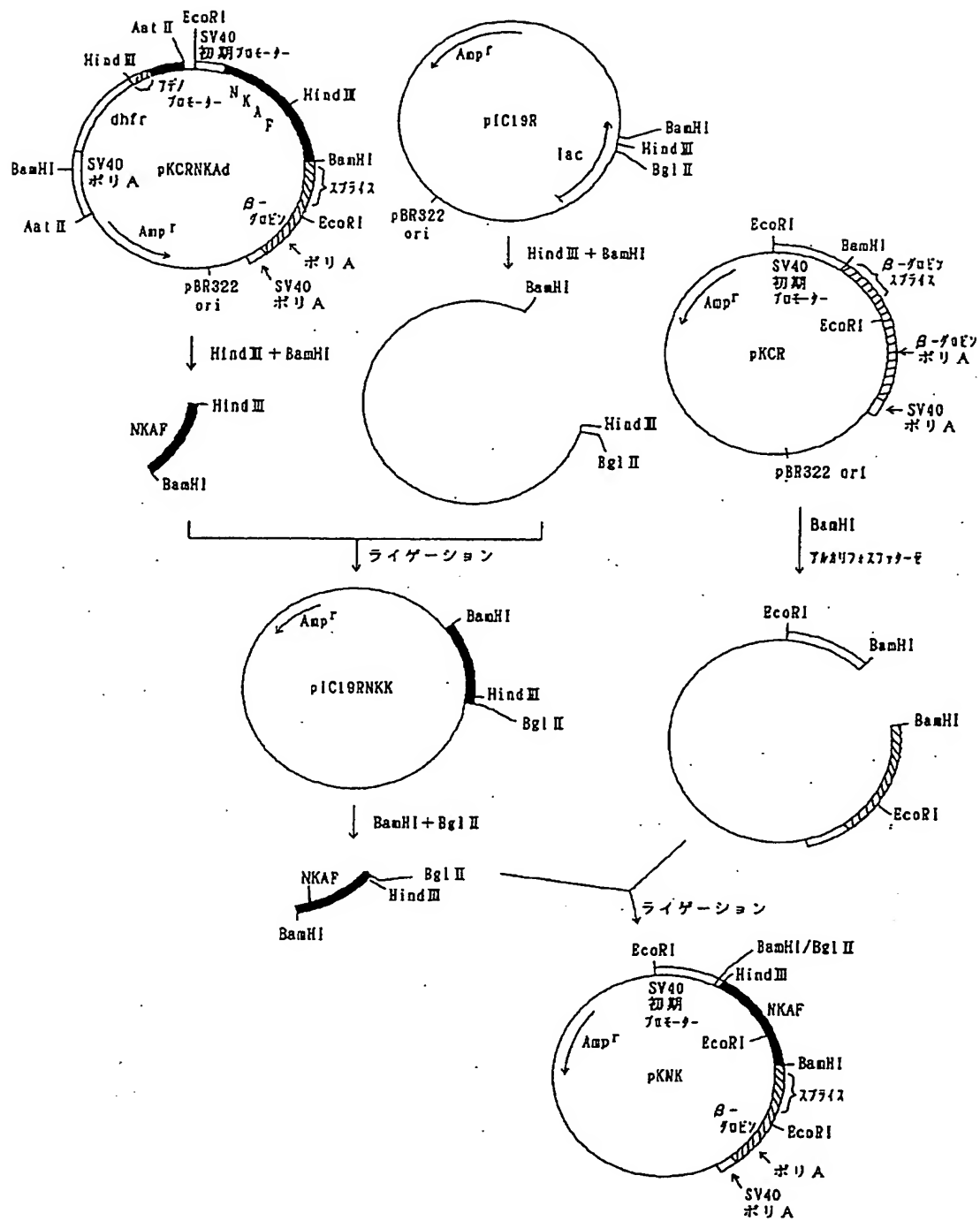
【図7】



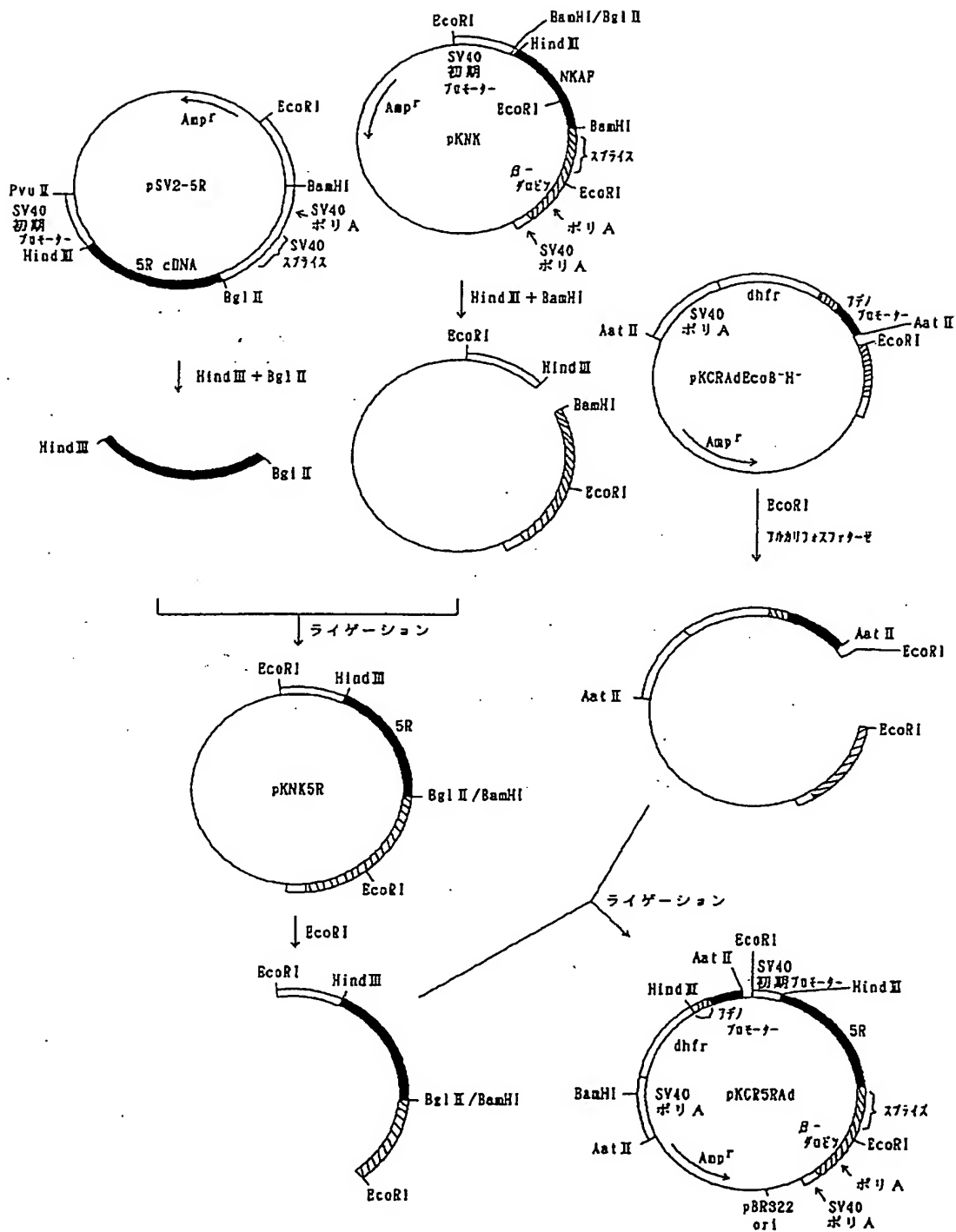
【図9】



【図8】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

// (C12P 21/02

C12R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 瀬戸 敏夫
茨城県牛久市栄町 3 丁目 160 番地 2

(72) 発明者 永岡 尚子
茨城県つくば市金田 1803 番地 1
(72) 発明者 水井 佳治
茨城県つくば市松代 4 丁目 9 番 10 号